

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

This Page Blank (uspto)

DOCKET NO: 0660-0139-0X PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Shirley LONGACRE-ANDRE, et al.
SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION
FILED: HEREWITH
INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR97/00290
INTERNATIONAL FILING DATE: FEBRUARY 14, 1997
FOR: RECOMBINANT PROTEIN CONTAINING A C-TERMINAL FRAGMENT OF
PLASMODIUM MSP-1

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

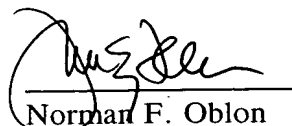
In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO.:</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
FRANCE	96/01822	14 FEBRUARY 1996

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. **PCT/FR97/00290**. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
William E. Beaumont
Registration No. 30,996

Crystal Square Five
Fourth Floor
1755 Jefferson Davis Highway
Arlington, Virginia 22202
(703) 413-3000

This Page Blank (uspto)

09/125031



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

PRIORITY DOCUMENT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 24-05-1997

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division

Yves CAMPENON

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75009 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

This Page Blank (uspto)

REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN TITRE DE PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE *

DATE DE REMISE DES PIÈCES
M-02-96

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL
96 01822 -

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT
75

a ☒ BREVET D'INVENTION
b ☐ CERTIFICAT D'UTILITÉ
c ☐ DEMANDE DIVISIONNAIRE
d ☐ TRANSFORMATION D'UNE
DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour les 3 premiers: Nature, N° et date de la
demande initiale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRE
DU RAPPORT DE RECHERCHE

☐ OUI ☒ NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE, IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ OUI ☒ NON

NATURE NUMERO DATE DE LA DEMANDE INITIALE

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À LAQUELLE TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

ERNEST GUTMANN - YVES
PLASSERAUD S.A.
3, rue Chauveau-Lagarde
75008 PARIS (FRANCE)

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT
B3044 - EG

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT
44-51-18-00

7 TITRE DE L'INVENTION **PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT UN FRAGMENT
C-TERMINAL DE LA PROTEINE MSP-1
D'UN PLASMODIUM INFECTIEUX POUR L'HOMME
POUR LA PRODUCTION DE VACCINS ANTI-PALUDIQUES**

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

INSTITUT PASTEUR
Fondation privée reconnue d'utilité publique

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

25-28, rue du Dr. Roux
75724 PARIS CEDEX 15

PAYS
FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)
FRANCAISE

11 INVENTEUR(S)
LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR ☐ OUI ☒ NON

12 SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT OU A REQUIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES ☐ OUI ☒ NON

DE DÉPÔT REDEVANCES VERSÉES

DE RAPPORT DE RECHERCHE

DE RÉVENDICATION DE PRIORITÉ

DE RÉVENDICATION (à partir de la 11e)

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ
DU REQUÊTEUR DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE DATE DE DÉPÔT NUMERO

14 DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA
PRÉSENTE DEMANDE N° N° N° N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE N° D'INSCRIPTION

**ERNEST GUTMANN - YVES
PLASSERAUD S.A.
GUTMANN Ernest n° 92-1106**

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Cocher la case choisie

LES ENCADRES GRAS SONT RÉSERVÉS À L'ADMINISTRATION

290

UNION DES PATENTAIRES

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
1, 5, 12, 30				31/07/96	05 AOUT 1996 - S.R
34, 35, 37, 38			X	31/07/96	05 AOUT 1996 - S R
Planches non numérotées (1 à 9/9)		Planches 40 et 41/41		05/08/96	26 AOUT 1996 - S R

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

**PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT LA SEQUENCE
C-TERMINALE DE 19kDa D'UNE PROTEINE MSP-1
D'UN *PLASMODIUM* INFECTIEUX POUR L'HOMME
OU UN FRAGMENT DE CELLE-CI
5 POUR LA PRODUCTION DE VACCINS ANTI-PALUDIQUES**

L'invention concerne de nouveaux principes actifs de vaccins
dérivés de la protéine majeure de surface de formes mérozoïtes d'un
10 *Plasmodium* infectieux pour l'homme, plus généralement connue sous la
désignation MSP-1.

Cette protéine a déjà fait l'objet d'études nombreuses. Elle est
synthétisée dans le stade schizonte des parasites du type *Plasmodium*,
notamment *Plasmodium falciparum*, et est exprimée sous forme de l'un des
15 constituants majeurs de la surface des mérozoïtes aussi bien pendant le
stade hépatique que pendant le stade érythrocytaire du paludisme (1, 2, 3,
4). En raison du caractère prédominant et de la conservation dans toutes
les espèces de *Plasmodium* connues de cette protéine, il a été suggéré
qu'elle pourrait représenter un candidat pour la constitution de vaccins
20 anti-paludiques (5, 6).

Il en a encore été de même pour des fragments de cette protéine,
particulièrement des produits naturels de clivage dont l'on observe la
formation, par exemple au cours de l'invasion par le parasite des
érythrocytes de l'hôte infecté. Parmi, ces produits de clivage, on relèvera le
25 fragment C-terminal ayant un poids moléculaire de 42 kDa (7,8) qui est à
son tour clivé une nouvelle fois en un fragment N-terminal ayant un poids
moléculaire apparent conventionnel de 33 kDa et en un fragment C-
terminal ayant un poids moléculaire apparent conventionnel de 19 kDa (9)
qui reste normalement fixé à la membrane du parasite au terme des
30 modifications dont il est lui-même l'objet, par l'intermédiaire de groupes du
type glycosylphosphatidylinositol (GPI) (10, 11).

On le retrouve encore au stade anneau précoce du cycle de développement intraérythrocytaire (15, 16), d'où les observations qui ont été faites que ce fragment de 19 kDa pourrait jouer un rôle non encore connu, mais sans doute essentiel dans les processus réinvasifs. De là
5 découlent les hypothèses déjà formulées dans le passé que cette protéine pourrait constituer une cible particulièrement efficace pour d'éventuels vaccins.

Il sera entendu que les références souvent faites dans ce qui suit à des protéines p42 et p19 issues d'un certain type de *Plasmodium*
10 s'entendent comme se rapportant aux produits de clivage C-terminaux correspondants de la protéine MSP-1 de ce *Plasmodium*, ou, par extension, à des produits contenant sensiblement les mêmes séquences en acides aminés, obtenus par recombinaison génétique ou par synthèse chimique selon les techniques classiques, par exemple par synthétiseur de
15 type « Applied System » ou par synthèse sur phase solide de type « Merrifield ». Pour la commodité du langage, les références à des « p42 recombinantes » et des « p19 recombinantes » se rapportent à des « p42 » et « p19 » obtenues par des techniques comportant au moins une étape de génie génétique.

20 Devant la difficulté d'obtenir des quantités importantes de parasites pour *P.falciparum* et l'impossibilité de cultiver *P.vivax in vitro*, il est devenu évident que le seul moyen de produire un vaccin antipaludique nécessite un recours aux techniques permettant l'utilisation des peptides ou protéines recombinantes. Mais, le MSP-1 est très difficile à produire en
25 entier à cause de sa grande taille d'environ 200 kDa, un fait qui a conduit les chercheurs à s'intéresser à la partie C-terminale dont la fonction, encore inconnue, est vraisemblablement la plus importante.

Au titre, des protéines recombinantes concernant la partie C-terminale de MSP-1 de *P.falciparum*, qui ont été produites et testées chez
30 le singe (12), on mentionnera :

- une p42 fusionnée avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli*;
- une p19 fusionnée avec un polypeptide issu d'une anatoxine tétanique et porteur d'épitopes de cellules T auxiliaires produites dans *S.cerevisiae*.

Une composition contenant la protéine de fusion p42 avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli* en association avec un adjuvant complet de Freund n'ont pas exercé d'effet protecteur dans les deux types de singes *Aotus* (*A.nancymai* et *A.vociferans*) auxquels elles avaient été administrées. La protéine p19 produite dans *S.cerevisiae* a exercé un effet protecteur dans deux singes *Aotus* de type *A.nancymai* (12). Par contre elle n'a pas exercé d'effet protecteur dans deux singes *Aotus* de type *A.vociferans*.

Certains chercheurs (Chang et al.) ont également rapporté des essais d'immunisation réalisés chez le lapin avec une protéine recombinante p42 produite dans un système baculovirus et contenant une séquence d'acides aminés en commun avec *P.falciparum* (18). Ainsi ces derniers auteurs indiquent-ils que cette p42 recombinante se comporte chez le lapin sensiblement de la même façon que la protéine MSP-1 recombinante entière (gp195). Ils suggèrent que la protéine p42 pourrait faire l'objet d'essais de protection dans des primates non-humains susceptibles à l'infection par *P.falciparum*, en particulier des singes *Aotus*, au motif que la protéine p42 comporterait des épitopes-cibles pour des anticorps inhibiteurs formés contre la protéine MSP-1 native purifiée gp195. Il serait néanmoins hasardeux, à supposer même que de tels résultats soient un jour confirmés, de conclure au caractère protecteur chez l'homme des anticorps ainsi induits à l'encontre des parasites eux-mêmes. Rappelons en effet qu'il n'existe pas actuellement de modèles expérimentaux très satisfaisants chez le primate pour *P. vivax* et *P.falciparum*. Le modèle *Saimiri*, qui a été développé pour *P.falciparum* et *P.vivax*, et le modèle *Aotus* pour *P.falciparum*, sont des systèmes

artificiels, nécessitant l'adaptation de souches de parasite et souvent la splénectomie des animaux pour obtenir des parasitémies significatives. En conséquence, les résultats de vaccination provenant de ces modèles ne peuvent avoir qu'une valeur prédictive limitée pour l'Homme.

5 On peut de toute façon aussi s'interroger sur ce que serait un taux réel de vaccination susceptible d'être éventuellement obtenu avec de telles protéines recombinantes, compte tenu de la constatation -rapportée plus loin- qui a été faite de la présence dans les p42 issues des *Plasmodiums* de la même espèce, et plus particulièrement dans les p33
10 correspondantes, de régions hypervariables qui rendraient aléatoires en de nombreux cas l'efficacité immunoprotectrice des anticorps induits chez des personnes vaccinées par une p42 issue d'une souche de *Plasmodium* à l'encontre d'une infection par d'autres souches de la même espèce (13).

 On peut même supposer que le polymorphisme important de la
15 partie N-terminale du p42 joue un rôle significatif dans l'échappement immunitaire, souvent observé pour ce type de parasites.

 La présente invention a pour objectif la production de protéines recombinantes vaccinales échappant à ces difficultés, dont l'effet protecteur est vérifiable dans des modèles expérimentaux réellement
20 significatifs, ou même directement chez l'homme.

 L'invention concerne plus particulièrement des compositions vaccinales contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif une protéine recombinante glycosylée ou non, dont la séquence polypeptidique constitutive
25 essentielle est celle :

- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de
30 pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;

- soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à ^{induire} ~~(réponse immunitaire capable d'inhiber une)~~ ~~une parasitémie normalement induite~~ in vivo ~~par le~~ ^{due au} parasite correspondant ;

- soit d'un peptide immunologiquement équivalent à ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant, de préférence, la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

La présence de ces épitopes conformationnels pourrait jouer un rôle important dans l'efficacité protectrice du principe actif de vaccins. On les retrouve tout particulièrement dans les principes actifs présentant par ailleurs les autres caractéristiques définies ci-dessus, lorsqu'ils ont été produits dans un système vecteur baculovirus. S'il en est besoin, il est mentionné ci-après que par l'expression « système de vecteur baculovirus » on entend l'ensemble que constitue le vecteur type baculovirus lui-même et les lignées cellulaires, notamment cellules d'insectes transfectables par un baculovirus modifié par une séquence à transférer dans ces lignées cellulaires avec pour résultat l'expression de cette séquence transférée. Des exemples préférés de ces deux partenaires du système baculovirus, ont été décrits dans l'article de Longacre et al. (19). C'est le même système qui a été utilisé dans les exemples qui suivent. Il va naturellement de soi que des variants, tant du baculovirus que des cellules infectables par ce baculovirus peuvent être utilisés en lieu et place de celui qui a été choisi.

Le caractère instable en milieu réducteur de ces épitopes conformationnels peut être mis en évidence, notamment par le test décrit plus loin dans les exemples, notamment en présence de β -mercaptoéthanol.

De ce point de vue, la protéine recombinante produite par S. Longacre et al. (14) peut être mise en oeuvre dans de tels compositions.

Il est rappelé que S. Longacre et al. réussirent à produire une p19 recombinante issue de la MSP-1 de *P.vivax* dans un système vecteur à baculovirus contenant une séquence nucléotidique codant pour la p19 de *Plasmodium vivax*, en particulier par transfection de cultures de cellules d'insectes [lignée de *Spodoptera frugiperda* (SF9)] avec des baculovirus vecteurs contenant, sous le contrôle du promoteur de la polyhédrine, une séquence codant pour les fragments peptidiques définis ci-dessous, dont les séquences étaient placées dans l'ordre suivant dans le vecteur baculovirus utilisé :

- 10 ◦ fragment 5'-terminal de 35 paires de bases de la séquence signal de la polyhédrine, dont avait été muté (en ATT) le codon méthionine d'initiation de l'expression de cette protéine;
- 15 ◦ un fragment 5'-terminal nucléotidique codant pour un peptide de 32 acides aminés correspondant à la partie N-terminale de MSP-1, y compris le peptide signal de MSP-1 ;
- 20 ◦ soit une séquence nucléotidique codant pour la p19, soit une séquence codant pour la p42 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium vivax*, ces séquences étant aussi, selon le cas, soit pourvues (formes « ancrées »), soit dépourvues (formes solubles) des régions d'extrémité 3' de ces séquences de nucléotides dont les produits d'expression C-terminaux extrêmes sont réputés jouer un rôle essentiel dans l'ancrage de la protéine finale p19 sur la membrane du parasite ;
- 30 ◦ 2 codons stop TAA.

Pour la p42, les séquences dérivées de la région C-terminale de MSP-1 s'étendaient par conséquent de l'acide aminé Asp 1325 à l'acide aminé Leu 1726 (forme ancrée) ou à l'acide aminé Ser 1705 (forme soluble) et pour la p19, les séquences s'étendaient de l'acide aminé Ile 1602 à l'acide aminé Leu 1726 (forme ancrée) ou à l'acide aminé Ser 1705 (forme soluble), étant entendu que les séquences en acides aminés complètes de p42 et p19 dont les acides aminés initiaux et terminaux ont

été indiqués dans ce qui précède découlent du gène de l'isolat Belem de *P.vivax* qui a été séquencé (20).

Des résultats semblables ont été obtenus en mettant en oeuvre dans les mêmes systèmes de vecteurs des séquences nucléotidiques codant pour la p42 et la p19 de *Plasmodium cynomolgi*. *P.cynomolgi* présente un double intérêt : c'est une espèce parasitaire très proche de *P.vivax* qui est infectieuse pour le macaque. Il peut aussi infecter l'Homme. On a également accès à des hôtes naturels de *P.cynomolgi*, les singes rhésus et les singes toques, pour tester l'efficacité de protection du MSP-1 de *P.cynomolgi* dans des systèmes naturels. Le singe rhésus est considéré comme une des espèces les plus représentatives des réactions immunitaires chez l'Homme.

En particulier, on a obtenu d'excellents résultats dans des essais de vaccination réalisés chez le singe toque avec deux polypeptides recombinants : la p42 et, surtout, la p19 solubles, dérivées de *P.cynomolgi*, respectivement produites dans un système baculovirus et purifiées sur colonne d'affinité avec des anticorps monoclonaux reconnaissant les régions correspondantes de la protéine MSP-1 native. Les observations suivantes ont été faites : les six singes immunisés avec le seul p19 (trois singes) et le 19 et p42 ensemble (3 singes) ont tous témoigné d'une immunité presque stérile après infection d'épreuve. Les résultats obtenus chez les trois singes immunisés avec le p42 ont été moins significatifs. Deux d'entre eux se sont comportés comme les précédents, mais si le troisième a manifesté une parasitémie moins importante que des témoins immunisés avec un tampon PBS en présence de l'adjuvant de Freund (3 singes) ou non immunisés (3 singes), elle n'en n'était pas moins patente.

Les résultats des essais particulièrement efficaces réalisés chez le macaque avec des polypeptides recombinants produits dans un système baculovirus mettant en oeuvre une p19 recombinante de *P.cynomolgi*, établissent que des polypeptides recombinants contenant respectivement des p19 recombinantes issus d'autres *Plasmodiums* doivent se comporter

de la même manière. Ils sont « plus parlants » pour le paludisme chez l'Homme que les résultats d'essais réalisés avec *P.vivax* ou *P.falciparum* dans leurs « hôtes artificiels ».

5 Les protéines recombinantes de baculovirus, dérivées d'une partie C-terminale de MSP-1 (p19), ont un effet protecteur antipaludique très significatif dans un système naturel, qui constitue le modèle d'évaluation de l'effet protecteur de MSP-1 le plus représentatif pour l'homme.

10 L'effet protecteur obtenu pourrait être d'autant meilleur que la forme p19 est dépourvue de la région hypervariable de la partie N-terminale du p42, dont l'effet peut être délétère dans des situations naturelles dans lesquelles le sujet vacciné est confronté à un polymorphisme important.

15 Le fragment C-terminal de 19 kDa dont la séquence est présente dans le principe actif du vaccin peut être limité à la séquence de la p19 elle-même, en l'absence de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence de p19 dans la protéine MSP-1 correspondante. Il va néanmoins de soi que la séquence polypeptidique constitutive essentielle du principe actif peut encore comporter une séquence polypeptidique du côté C-terminal appartenant au fragment N-terminal de 33 kDa (p33) encore associée à la p19 dans la p42 correspondante, avant
20 le clivage naturel de cette dernière, et cela chaque fois que la présence de ce fragment n'est pas de nature à modifier les propriétés immunologiques du principe actif du vaccin. Comme cela sera vu plus loin, notamment à propos de la description des exemples, les séquences C-terminales de la p33 de variétés diverses de *Plasmodium* (voir la partie C-terminale des
25 séquences peptidiques de la « région III » de la figure 4), présentent aussi encore un degré d'homologie ou de conservation substantielle de la séquence, par exemple de l'ordre de 80% au moins, dans différentes variétés de *Plasmodiums* infectieux pour l'homme, de sorte qu'elles ne sont pas de nature à modifier fondamentalement les propriétés
30 vaccinales du principe actif (dont la séquence correspond à la région IV) de la figure 4, en particulier dans l'hypothèse qui découle de cette figure le

site de clivage présumé entre la p19 et la région III de la p33 se situe entre les résidus leucine et asparagine dans une région particulièrement bien conservée (LNVQTQ).

5 Normalement la séquence polypeptidique C-terminale de la p33, lorsqu'elle est présente, comprend moins de 50 résidus d'acides aminés, voire même moins de 35, ou même moins de 10 résidus d'acides aminés.

A l'inverse, la séquence polypeptidique constitutive essentielle du principe actif de vaccin peut ne pas comporter la totalité de la séquence codant pour la p19, naturellement sous réserve que cette dernière
10 conserve la capacité d'induire des anticorps protecteurs contre le parasite. En particulier la susdite « partie de fragment a un poids moléculaire de 10 à 25 kDa, notamment de 10 à 15 kDa. De préférence, cette partie de fragment polypeptidique contient au moins l'une des deux régions EGF (abréviation de l'expression anglaise « Epidermal Growth Factor »).

15 Il est clair que l'homme du métier est à même de faire la différence entre les fragments actifs et ceux qui cesseraient de l'être, notamment de façon expérimentale en produisant des vecteurs modifiés contenant des insérats issus de la p19 de longueurs différentes, respectivement isolés à partir des fragments obtenus à partir de la séquence codante pour la p19,
20 par réaction avec des enzymes de restriction appropriés, ou encore par des enzymes exonucléolytiques qui auraient été maintenus au contact du fragment codant pour la p19 pendant des temps variables ; la capacité des produits d'expression de ces insérats dans des cellules eucaryotes correspondantes, notamment des cellules d'insectes, transformées par les
25 vecteurs modifiés correspondants, à exercer un effet protecteur, pouvant alors être testée, notamment dans les conditions expérimentales qui seront décrites plus loin, à propos des exemples. En particulier, les produits d'expression de ces insérats doivent être aptes à inhiber une parasitémie induite *in vivo* par le parasite correspondant entier.

30 De même, l'invention inclut toutes compositions vaccinales dans lesquelles la séquence polypeptidique constitutive essentielle du principe

actif serait constitué d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par la p19 ou au fragment tel qu'il vient d'être défini, dès lors que l'addition, la délétion ou la substitution dans sa séquence de certains acides aminés par d'autres n'entraîneraient pas une modification importante de la capacité du peptide ainsi modifié -ci-après appelé « peptide immunologiquement équivalent »- à aussi inhiber la susdite parasitémie.

Le fragment de la p19 peut naturellement aussi être associé que ce soit du côté N-terminal ou du côté C-Terminal ou par l'intermédiaire d'une liaison peptidique à un autre fragment de protéine plasmodiale ayant un potentiel vaccinant comme par exemple une protéine (« Duffy Binding Protein » de *P. vivax* (29) ou EBA-175 de *P. falciparum* (30) et (31) dont une région est spécifiquement riche en cystéine), sous réserve que ne soit pas altérée, au contraire amplifiée, sa capacité d'inhiber une parasitémie normalement introduite in vivo par le parasite correspondant.

Le fragment codant pour la p19 ou une partie de celle-ci, peut contenir également, en amont de l'extrémité N-terminale de p19, une séquence peptidique encore différente, par exemple à un fragment C-terminal du peptide signal utilisé, tel que celui de la protéine MSP-1. Cette séquence comprend de préférence moins de 50 acides aminés, par exemple de 10 à 35 acides aminés.

Ces observations s'étendent de la même façon à des p19 issues d'autres *Plasmodium*, en particulier *P. falciparum*, l'espèce dominante des parasites, responsable d'une des formes les plus graves de paludisme.

Mais les techniques rappelées ci-dessus pour la production dans un système de baculovirus d'une p19 recombinante issue de *P. vivax* ou *P. cynomolgi* sont difficilement transposables telles quelles à la production d'une p19 recombinante de *P. falciparum* avec un rendement satisfaisant, ne fût-ce que pour obtenir des quantités appréciables autorisant la réalisation d'essais d'immunoprotection.

L'invention fournit également un procédé remédiant en grande partie à cette difficulté. Il devient aussi possible d'obtenir des rendements beaucoup plus importants en p19 de *P.falciparum* -et d'autres *Plasmodiums* lorsque l'on rencontre des difficultés semblables- en mettant en oeuvre une séquence nucléotidique synthétique de substitution à la séquence nucléotidique naturelle codant pour la p19 de *Plasmodium falciparum* dans un vecteur d'expression d'un système baculovirus, cette séquence nucléotidique synthétique codant pour la même p19, mais étant caractérisée par une proportion de nucléotides G et C plus élevée que dans la séquence nucléotidique naturelle.

En d'autres termes, l'invention découle de la découverte que l'expression dans un système baculovirus d'une séquence nucléotidique codant pour une p19, était apparemment liée à une compatibilité améliorée des codons successifs de la séquence nucléotidique à exprimer avec la « machinerie cellulaire » des cellules hôtes transformables par des baculovirus, à l'instar de ce qui est observé pour les séquences nucléotidiques naturelles normalement contenues dans ces baculovirus et exprimées dans les cellules hôtes infectées ; d'où la mauvaise expression, sinon parfois l'absence totale d'expression d'une séquence nucléotidique native de *P.falciparum* ; d'où également une explication possible à l'expression plus efficace observée de la p19 de *P.vivax* dans un système baculovirus par Longacre et al. (14) et, comme les inventeurs l'ont aussi constaté, de la séquence de *P.cynomolgi* à partir des séquences nucléotidiques p19 natives correspondantes, en raison de leurs teneurs relatives en nucléotides G et C beaucoup plus élevées que celles des séquences nucléotidiques natives codant pour les p19 de *P.falciparum*.

L'invention concerne donc aussi, plus généralement, un vecteur modifié du type baculovirus recombinant contenant sous le contrôle d'un promoteur contenu dans ce vecteur et susceptible d'être reconnu par des cellules transfectables par ce vecteur, une première séquence nucléotidique codant pour un peptide signal exploitable par un système

baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence nucléotidique en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et code pour la séquence peptidique :

- 5 ° soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* autre que *Plasmodium vivax* et infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- 10 ° soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est apte aussi à ~~conduire une réponse immunitaire capable d'~~ inhiber une parasitémie normalement induite in vivo par le parasite correspondant ;
- 15 ° soit d'un peptide immunologiquement équivalent dérivé du susdit fragment peptidique C-terminal (p19) ou de la susdite partie de fragment peptidique par addition, délétion ou substitution d'acides aminés n'entraînant pas une modification importante de la capacité de ce peptide immunologiquement équivalent à induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale semblable à celle
- 20 produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

ladite séquence nucléotidique ayant le cas échéant une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% de la totalité des nucléotides dont elle est constituée. Cette séquence

25 peut être obtenue par construction d'un gène synthétique dans lequel les codons naturels ont été changés par des codons riches en G/C sans que leur traduction soit modifiée (maintien de la séquence peptidique).

En l'occurrence ladite séquence nucléotidique, fournie par un ADN synthétique, peut présenter au moins 10% de codons modifiés par rapport

30 à la séquence du gène ou du cDNA naturel tout en conservant les

caractéristiques de la séquence naturelle traduite, c'est-à-dire le maintien de la séquence en amino-acides.

Cela étant, on n'exclut pas que cette teneur en nucléotides G et C pourrait être davantage accrue, dès lors que les modifications qui en résulteraient quant à la séquence en acides aminés du peptide recombinant -ou peptide immunologiquement équivalent-produit n'entraîneraient pas une perte des propriétés immunologiques, voire protectrices, des protéines recombinantes formées, notamment dans les essais qui seront illustrés plus loin.

Ces observations s'appliquent naturellement à d'autres *Plasmodium* infectieux pour l'homme, en particulier dès lors que des séquences nucléotidiques natives codant pour les p19 correspondantes, auraient des teneurs en nucléotides T et A difficilement compatibles avec une expression efficace dans un système baculovirus.

La séquence codant pour le signal utilisé peut être celle normalement associée à la séquence native du *Plasmodium* concerné. Mais elle peut également être issue d'un autre *Plasmodium*, par exemple *P.vivax* ou *P.cynomolgi* ou d'un autre organisme s'il est susceptible d'être reconnu en tant que signal dans un système baculovirus.

La séquence codant pour la p19 ou un fragment de celle-ci au sein du vecteur considéré est, le cas échéant, dépourvue de la séquence d'ancrage de la protéine native au parasite dont elle est issue, cas dans lequel la protéine exprimée est en général excrétée dans le milieu de culture (forme soluble). Il est d'ailleurs remarquable à cet égard que dans les conditions de l'invention, les formes solubles et ancrées de protéines recombinantes produites, en particulier lorsqu'elles sont issues de *P.falciparum* ou *P.cynomolgi* ou *P.vivax*, ont tendance à former des oligomères, cette propriété pouvant être à l'origine des immunogénicités accrues des protéines recombinantes formées.

L'invention concerne tout autant les vecteurs dans lesquels la séquence codante contient la séquence d'extrémité 3' terminale codant

pour la séquence d'extrémité C'-terminale hydrophobe de la p19 et qui est normalement impliquée dans l'induction de l'ancrage de la protéine native à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée. Cette région d'extrémité 3'-terminale peut d'ailleurs être hétérologue vis-à-vis de la séquence codant pour la partie soluble de p19, par exemple correspondre à la séquence 3'-terminale issue de *P.vivax* ou d'un autre organisme dès lors qu'elle code pour une séquence d'ancrage de l'ensemble de la protéine recombinante produite à la membrane de l'hôte cellulaire du système baculovirus mis en oeuvre. A titre d'exemple de telles séquences d'ancrage on cite la GPI de l'antigène CD59 exprimable dans des cellules d'insectes du type *Spodoptera frugiperda* (32) ou la GPI d'une protéine humaine CD14 (33).

L'invention concerne naturellement aussi les protéines recombinantes, ces protéines comportant des épitopes conformationnels reconnus par des sérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

D'une façon générale, l'invention concerne également toute protéine recombinante du type indiqué ci-dessus, dès lors qu'elle comporte des épitopes conformationnels tels que produits dans le système baculovirus, notamment ceux qui se trouvent être instables en milieu réducteur.

L'invention concerne naturellement lesdites protéines recombinantes, qu'elles soient sous la forme dite soluble ou sous la forme pourvue d'une région d'ancrage, en particulier aux hôtes cellulaires mis en oeuvre dans le système baculovirus.

Entrent également dans le champ de l'invention, les oligomères produits spontanément dans les systèmes baculovirus utilisés ou produits a posteriori, en ayant recours à des techniques classiques d'oligomérisation de protéines. La technique couramment utilisée met en oeuvre le glutaraldéhyde. Mais tout système classique de pontage entre des fonctions respectivement amine et carboxyle, telles qu'on les retrouvent dans les protéines pourra également être utilisé. A titre

d'exemples, on peut mettre en oeuvre l'une quelconque des techniques décrites dans la demande de brevet européen 0602079.

Par « oligomère » on entend une molécule contenant de 2 à 50 unités monomère, chacune de ces unités monomère contenant la p19 ou un fragment de celle-ci, tel que défini ci-dessus, capable de former un agrégat. L'invention porte également sur tout produit de conjugaison entre une p19 ou fragment de p19 tel que défini ci-dessus, d'une part, et une molécule porteuse –par exemple une polylysine-alanine– utilisable pour la production des vaccins, d'autre part, par l'intermédiaire de liaisons covalentes ou non. Les compositions vaccinales les mettant en oeuvre font également partie de l'invention.

L'invention concerne également les compositions de vaccins mettant en oeuvre ces protéines recombinantes oligomères ou conjugués, y inclus d'ailleurs les protéines issues de *Plasmodium vivax*, ces observations s'étendant également aux oligomères de ces protéines recombinantes.

Font également partie de l'invention les compositions dans lesquelles les protéines recombinantes susmentionnées sont associées à un adjuvant, par exemple un alun. Les protéines recombinantes comportant l'extrême région C-terminale permettant leur ancrage à la membrane des cellules dans lesquelles elles sont produites sont avantageusement utilisées en combinaison avec des lipides aptes à former des liposomes et appropriés à la production de vaccins. Sans qu'il y ait eu lieu de s'y limiter, on peut avoir recours aux lipides décrits à cet effet par exemple dans l'ouvrage intitulé « Les liposomes aspects technologique, biologique et pharmacologique » de J. Delattre et al., édition INSERM, 1993.

La présence de la région d'ancrage dans la protéine recombinante, qu'il s'agisse d'une région d'ancrage homologue ou hétérologue vis-à-vis de la partie vaccinale proprement dite, est de nature à favoriser la production d'anticorps cytophiles, notamment du type IgG_{2a} et IgG_{2b} chez la souris qui pourraient avoir une activité protectrice particulièrement élevée,

au point que l'on pourrait se dispenser d'associer les principes actifs de vaccins ainsi constitués avec des adjuvants autres que les lipides utilisés pour la constitution des formes liposomiques. Il s'agirait là d'un avantage important, puisque les liposomes peuvent être lyophilisés dans des conditions permettant leur stockage et leur transport, sans que des chaînes de froid ne soient alors indispensables.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit d'exemples de protéines recombinantes entrant dans le cadre de l'invention et des conditions dans lesquelles elles peuvent être produites, sans que ces exemples soient de nature à limiter la portée de l'invention.

Description de la construction PfMSP1_{p19}S (soluble) (p19 soluble issue de *P.falciparum*)

La construction recombinante PfMSP1_{p19}S contient de l'ADN correspondant aux 8 paires de base de la séquence leader et les 32 premiers acides aminés de MSP1 de *Plasmodium vivax* de Met₁ à Asp₃₂ (isolat Belem ; Del Portillo et al. 1991. P.N.A.S. 88, 4030.) suivis par un GluPhe, dû au site EcoR1 faisant la liaison des deux fragments. Le tout est suivi par le gène synthétique, décrit dans Figure 1, codant le *Plasmodium falciparum* MSP1_{p19} de Asn₁₆₁₃ à Ser₁₇₀₅ (isolat Uganda-Palo Alto ; Chang et al. 1988. Exp. Parasitol. 67,1). La construction est terminée par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est sécrétée dans le surnageant de culture des cellules infectées.

De la même façon et à des fins de comparaisons, on a produit une construction recombinante dans des conditions semblables à celles utilisées pour la production de la p19 ci-dessus, mais en travaillant avec une séquence codante consistant en une copie directe de l'ADN correspondant de la souche *P.falciparum* (FUP) décrite par Chang et al., Exp. Parasit. 67,1; 1989. La copie de ce gène naturel (s'étendant de

l'asparagine 1613 à la sérine 1705) a été formée par PCR à partir du gène natif.

On a représenté dans la **Figure 1A** les séquences à la fois du gène synthétique (Bac19) et du « gène natif » (PF19).

On remarque que 57 codons sur les 93 codons de la séquence codante native pour la p19 issue de *P.falciparum* ont été modifiés (pour ce qui est du troisième nucléotide dans 55 d'entre eux et du premier et troisième nucléotides dans les deux codons restant). Des codons nouveaux ont été ajoutés à l'extrémité 5' pour introduire le peptide signal dans les conditions qui ont été indiquées ci-dessus et pour introduire un site EcoRI pour le clonage, d'une part, et de même ont été ajoutés deux codons stop non présents dans la p19 de *P.falciparum* aux fins d'obtenir des signaux de terminaison de l'expression. Les lettres individualisées placées respectivement au dessus des codons successifs correspondent aux acides aminés respectifs successifs. Les astérisques (*) se rapportent aux codons stop. Les lignes verticales soulignent les nucléotides qui sont les mêmes dans les deux séquences.

Description de la construction PfMSP1_{p19}A (ancré GPI) (p19 ancree de *P.falciparum*)

La construction PfMSP1_{p19}A a des caractéristiques de la précédente sauf que la séquence synthétique (**Figure 1B**) code pour le MSP1_{p19} de *Plasmodium falciparum* (isolat Uganda-Palo alto) de Asn₁₆₁₃ à Ile₁₇₂₆ suivie par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est ancree dans la membrane plasmique des cellules infectées par une structure du type glycosyl phosphatidyl inositol (GPI).

La **figure 1C** est représentative de la séquence de la protéine recombinante PfMSP1_{p19}S avant coupure de la séquence signal.

La figure 1D est représentative de la séquence de la protéine recombinante PfMSP1_{p19}S après coupure de la séquence signal.

5 Les acides aminés soulignés dans les figures 1C et 1D proviennent du site EcoR1 utilisé pour joindre les séquences nucléotidiques dérivées de la partie N-terminale de MSP1 de *P.vivax* (avec séquence signal) et de MSP1_{p19} de *P.falciparum*.

10 **Figure 2** - L'antigène recombinant PfMSP1_{p19} soluble purifié par immunoaffinité a été analysé par immunoblot après SDS-PAGE en présence (réduit) ou absence (non réduit) de B-mercaptoéthanol. Les échantillons sont chargés sur gel après chauffage à 95°C en présence de 2% SDS. Dans ces conditions seulement des liaisons du type covalent (ponts disulfure) peuvent résister à la désagrégation. Le blot de gauche a
15 été révélé avec un anticorps monoclonal qui réagit avec un épitope linéaire de la p19 naturelle. Le blot de droite a été révélé avec un mélange de 13 antisera humains provenant des sujets avec une immunité acquise au paludisme dû à *Plasmodium falciparum*. Ces résultats montrent que la molécule recombinante de baculovirus reproduit bien les épitopes
20 conformationnels en forme de polymère qui sont reconnus en majorité par l'antiserum humain.

Figure 3 - L'antigène recombinant PvMSP1_{p42} soluble (Longacre et al. 1994, op.cit.) a été incubé pendant 5 heures à 37° en présence des
25 fractions de protéines dérivées des mérozoïtes de *P.falciparum* et séparées par isoélectrofocalisation. Par la suite les échantillons ont été analysés par immunoblot en présence (réduit) ou absence (non réduit) de B-mercaptoéthanol. Les fractions 5 à 12 d'isoélectrofocalisation, ainsi que deux extraits totaux de mérozoïtes faits en présence (Tex) ou absence (T)
30 de détergent ont été analysés. L'immunoblot a été révélé avec des anticorps monoclonaux spécifiques pour le MSP1_{p42} et p19 de *P.vivax*. Les

résultats suggèrent qu'il y a une activité protéolytique dans les mérozoïtes
 de *P.falciparum* qui peut être extraite en détergent. La digestion du p42
 dans certaines fractions semble provoquer une polymérisation des produits
 de digestion (p19); cette polymérisation est probablement liée à la
 5 formation de ponts disulfure puisqu'en présence de B-mercaptoéthanol, les
 formes de haut poids moléculaire disparaissent en faveur d'une molécule
 d'environ 19 kDa (Tex-R). La polymérisation du p19 observée dans ces
 expériences pourrait donc être une propriété intrinsèque de cette molécule
in vivo.

10

Description de la construction PcMSP1_{p19}S (soluble) (p19 soluble de *P.cynomolgi*)

L'ADN utilisé pour la construction susdite a été obtenu à partir d'un
 clone de la souche de *Plasmodium cynomolgi ceylonensis* (22-23). Cette
 15 souche a été maintenue par des passages successifs dans son hôte
 naturel (*Macaca sinica*) et des transmissions cycliques par l'intermédiaire
 de moustiques (27).

Des parasites sanguins ont été obtenus à partir des singes infectés
 au stade schizonte mature quand les parasitémies ont atteint un niveau de
 20 5%. Ils ont alors été purifiés selon la méthodes décrites dans (25). L'ADN a
 ensuite été extrait comme décrit dans (26).

Un fragment de 1200 paires de base a ensuite été produit en ayant
 recours à la réaction PCR mettant en oeuvre les oligonucléotides
 soulignés dans la **Figure 4** et issus de *P.vivax*. L'oligonucléotide 5'
 25 comprenait un site de restriction EcoRI et l'oligonucléotide 3' deux codons
 synthétiques stop TAA suivis d'un site de restriction BglII. Ce fragment a
 été introduit par ligation et par l'intermédiaire de ces sites EcoRI et BglII
 dans le plasmide pVLSV₂₀₀ contenant déjà la séquence signal de la
 protéine MSP-1 de *P.vivax* (19). Le nouveau plasmide (pVLSV₂₀₀C₄₂) a été
 30 utilisé pour l'analyse de séquences d'ADN.

Les séquences de *P.cynomolgi* et des séquences correspondantes de *P.vivax* ont été mises en alignement. Les flèches noires désignent les sites de clivage primaire et secondaire présumés. Ils ont été déterminés par analogie avec les sites connus dans *P.falciparum* (27, 28). Des lignes
 5 verticales et des flèches horizontales localisent les limites des quatre régions qui ont été étudiées. La région 4 correspond à la séquence codant pour la p19 de *P.cynomolgi*. Des sites de glycosylation sont encadrés et les cystéines conservées sont soulignées. Dans la partie inférieure de la **Figure 4** sont indiqués les pourcentages identité entre les deux isolats de
 10 *P.vivax* et *P.cynomolgi*.

La construction recombinante PcMSP1_{p19}S contient de l'ADN correspondant aux 8 paires de bases de la séquence « leader » et les 32 premiers acides aminés de MSP1 de *Plasmodium vivax* de Met₁ à Asp₃₂ (isolat Belem ; Del Portillo et al. 1991. P.N.A.S. 88, 4030.) suivis par un
 15 GluPhe, dû au site EcoR1 faisant la liaison des deux fragments. Le tout est suivi par la séquence codant pour le MSP1_{p19} de *Plasmodium cynomolgi* (souche Ceylon) de Lys₂₇₆ à Ser₃₈₀. La construction est terminée par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est sécrétée dans le surnageant de culture des cellules
 20 infectées.

Purification de la protéine recombinante PfMSP1p19 par chromatographie d'immunoaffinité avec un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement la p19 de *Plasmodium falciparum*.

La résine de chromatographie a été préparée en liant 70 mg d'un anticorps monoclonal à 3g de CNBr-Sepharose 4B activé (Pharmacia) par des méthodes standards détaillées dans le mode d'emploi fourni par Pharmacia. Les surnageants de culture contenant le PfMSP1p19 soluble ont été incubés en batch avec la résine de chromatographie pendant 16
 25 heures à 4°C. La colonne a été lavée une fois avec 20 volumes de 0.05% NP40, 0.5M NaCl, PBS ; une fois avec 5 volumes de PBS et une fois avec
 30

2 volumes de 10 mM phosphate de sodium, pH 6.8. L'élution a été effectuée avec 30 ml de 0.2 M glycine, pH 2.2. L'éluat a été neutralisé avec 1 M phosphate de sodium, pH 7.7 puis concentré par ultrafiltration et dialysé contre du PBS. Pour la purification du PfMSP1p19 ancré, toutes les solutions de lavage et élution contenaient en supplément 0.1% 3- (Dimethyl-dodecylammonio)-propane sulfonate (Fluka).

Essai de vaccination de MSP1 recombinant de *Plasmodium vivax* (p42 et p19) chez le singe écureuil *Saimiri sciureus*.

Cet essai de vaccination a été fait chez des *Saimiri sciureus boliviensis* mâles de 2 à 3 ans, non splénectomisés. Trois singes ont été injectés 3 fois par voie intramusculaire à 3 semaines d'intervalle avec un mélange d'environ 50 à 100 µg chacun, de PvMSP1_{p42} et _{p19} soluble recombinant (19), purifié par immunoaffinité. L'adjuvant de Freund complet et incomplet était utilisé comme suit : 1^{ère} injection : 1:1 FCA/FIA ; 2^{ème} injection 1:4 FCA/FIA ; 3^{ème} injection : FIA. Ces compositions d'adjuvant étaient mélangées par la suite 1:1 avec l'antigène en PBS. Les cinq singes contrôles recevaient l'antigène glutathione-S-transferase (GST) produit dans *E.coli* selon le même protocole. L'infection d'épreuve était effectuée en injectant 2.10^6 hématies infectées avec une souche adaptée de *Plasmodium vivax* (Belem) 2.5 semaines après la dernière injection. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémiés journalières chez tous les animaux par examen des frottis colorés avec giemsa.

Les courbes de la **Figure 5** sont représentatives de la variation de la parasitémie mesurée en nombre d'hématies parasitées par microlitre de sang (sur l'axe des ordonnées à l'échelle logarithmique) en fonction du temps écoulé après l'infection (en jours). La courbe A correspond aux valeurs moyennes observées chez les trois singes vaccinés, la courbe B ; les valeurs moyennes chez cinq singes témoins.

De l'examen de la figure découle une très forte réduction de la parasitémie sous l'effet de la vaccination.

Essai de vaccination de MSP1 recombinant de *Plasmodium cynomolgi* (p42 et p19) chez le singe toque, *Macaca sinica*.

Quinze singes capturés ont été utilisés comme suit : (1) 3 animaux injectés avec 100 µg PcMSP1_{p42} soluble ; 3 animaux injectés avec 35 µg (1^{ère} injection) ou 50 µg (2^{ème} et 3^{ème} injections) PcMSP1_{p19} soluble ; (3) 3 animaux injectés avec un mélange de PcMSP1_{p42} et p19 ; (4) 3 animaux injectés avec l'adjuvant plus PBS ; (5) 3 animaux non injectés. L'adjuvant de Freund complet et incomplet a été utilisé selon le protocole décrit ci-dessus. Les injections ont été faites par voie intramusculaire à 4 semaines d'intervalle. L'infection d'épreuve était faite en injectant 2.10^5 hématies infectées avec *Plasmodium cynomolgi* 4 semaines après la dernière injection. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémiés journalières chez tous les animaux en examinant les parasitémiés avec giemsa. Les parasitémiés ont été classées comme négatives uniquement après comptage de 400 champs de frottis. Les parasitémiés sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées.

Les **Figures 6A-6F** sont illustratives des résultats obtenus. Dans chacune d'elles apparaissent les parasitémiés (exprimées en pourcentages d'hématies parasitées sur l'axe des ordonnées à l'échelle logarithmique) observées chez les animaux d'épreuve en fonction des temps après l'infection (en jours sur les axes des abscisses).

Les résultats concernent :

- dans la **figure 6A** ; des animaux contrôles non vaccinés ;
- la **figure 6B** concerne des animaux qui avaient reçu une solution saline contenant en outre l'adjuvant de Freund ;
- la **figure 6C** est une superposition des figures 6A et 6B, dans le but de faire apparaître les résultats relatifs résultant de l'administration de l'adjuvant de Freund aux animaux (les variations ne sont évidemment pas significatives) ;

- la **figure 6D** fournit les résultats obtenus à l'issue d'une vaccination avec la p42 ;
- la **figure 6E** concerne des animaux vaccinés avec la seule p19 ;
- enfin, la **figure 6F** concerne les animaux vaccinés avec un mélange de p19 et p42.

La p42 induit certes un certain niveau de protection. Mais comme en témoignent les figures 6E et 6F, la protection conférée par la p19 recombinante selon l'invention est considérablement améliorée.

On peut formuler l'hypothèse que l'amélioration de la protection résulte d'un clivage secondaire de la p42 qui s'accompagne du dévoilement de cystéine libre qui forme, par la suite, des ponts disulfure intermoléculaires donnant lieu à des multimères du p19 très caractéristiques de cette forme dans les protéines recombinantes des trois espèces testées.

Essai de vaccination avec une p19 recombinante de *Plasmodium falciparum* chez le singe écureuil.

Des singes élevés en captivité ont été injectés avec 1 ml d'inoculum par voie intramusculaire 2 fois à 4 semaines d'intervalle comme suit : (1) 4 animaux injectés avec 50 µg de PfMSP1p19 soluble en présence d'adjuvant de Freund comme suit: 1^{ère} injection 1:1 FCA/FIA; 2^{ème} injection 1:4 FCA/FIA; et mélangés par la suite 1:1 avec l'antigène en PBS; (2) 4 animaux injectés avec 50 µg de PfMSP1p19 soluble en présence de 10 mg d'alun; (3) 4 animaux injectés avec environ 50 µg de PfMSP1p19 ancré GPI reconstitués en liposomes composés 1:1 en molarité de cholestérol et phosphatidyl choline. Les animaux ont été saignés 17 jours après la deuxième injection.

Les globules rouges provenant d'un singe écureuil avec 30% de parasitémie due à *P. falciparum* (avec des formes mûres en majorité) ont été lavés en PBS et le culot était dilué 8 fois en présence de 2% SDS et

2% dithiothreitol et chauffé à 95° avant d'être chargé sur un gel de polyacrylamide de 7.5% (gel de séparation) et 4% (gel de stacking) (haut du gel). Après transfère en nitrocellulose l'analyse par immunoblot (immunoempreinte) a été fait avec des antisera comme suit: (1) pool d'antiseras des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 soluble en adjuvant de Freund dilué au vingtième ; (2) pool d'antiseras des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 soluble en adjuvant alun dilué au vingtième ; (3) pool d'antiseras des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 ancré en liposomes dilué au vingtième ; (4) l'anticorps monoclonal, qui réagit avec un épitope linéaire de PfMSP1p19, à 50 µg/ml ; (5) pool d'antiseras SHI90 provenant d'un vingtaine de singes infectés à répétition par *P. falciparum* et devenus réfractaires à toute infection ultérieure de *P. falciparum*, dilué au cinq centième ; (6) pool d'antiseras des singes naïfs (n'ayant jamais été exposés à *P. falciparum*) dilué au vingtième.

Les résultats montrent que les 3 pools d'antiseras des singes vaccinés avec le PfMSP1p19 réagissent de façon importante et spécifique avec des complexes de très haut poids moléculaire (se trouvant de façon diffuse dans le gel de stacking) et présents dans des extraits de parasite contenant davantage de formes mûres. Ces résultats confortent l'hypothèse de la présence d'une agrégation spécifique du MSP1p19 *in vivo* comportant des épitopes qui sont reproduits dans les molécules recombinantes PfMSP1p19 synthétisées dans le système baculovirus, en particulier celles en forme d'oligomère.

La figure 7 illustre également ces résultats. Elle se rapporte aux immunoempreintes produites sur gel. Les trois premières colonnes du gel illustrent la réponse *in vivo* de singes à des injections de p19 [(1) avec l'adjuvant de Freund, (2) avec de l'alun, (3) sous forme de liposome] et notamment l'existence de complexes de haut poids moléculaire confortant l'hypothèse de l'agrégation *in vivo* de p19 sous forme d'oligomère, spécifique du stade de maturation (quand p42 est coupé en p19 et p33).

Cet essai de vaccination comprend également une troisième injection identique aux précédentes. L'injection avec l'adjuvant de Freund comprend uniquement du FIA.

Il y a deux animaux contrôles pour chaque groupe à savoir : 2 animaux contrôles injectés avec PBS et l'adjuvant de Freund ; 2 animaux contrôles injectés avec PBS et alun ; 2 animaux contrôles injectés avec liposomes sans protéine ; et deux animaux injectés avec PBS sans adjuvant. La protection est évaluée comme décrit ci-dessus.

L'invention concerne naturellement d'autres applications, par exemple celles exposées ci-après en rapport avec certains des exemples, lesquels ne présentent aucun caractère limitatif.

Thérapeutique

La molécule recombinante PfMSP1p19 peut être utilisée pour produire des anticorps spécifiques éventuellement utilisables par transfert passif dans un but de thérapeutique adaptée au paludisme sévère dû à *P. falciparum* avec risque de mortalité.

Diagnostic

Les molécules recombinantes PfMSP1p19 dérivées de baculovirus peuvent et ont été utilisées pour produire des anticorps monoclonaux spécifiques murins. Ces anticorps, en combinaison avec des antisera polyclonaux anti MSP1p19 provenant d'une autre espèce telle que le lapin ou la chèvre, peuvent être à la base d'un test de diagnostic semi-quantitatif pour le paludisme et capable de distinguer entre un paludisme dû à *P. falciparum*, qui peut être mortel, et un paludisme dû à *P. vivax*, qui n'est généralement pas mortel. Le principe de ce test serait de piéger et quantifier toute molécule de MSP1 contenant la partie p19 dans le sang.

Dans ce cadre, les avantages de la molécule MSP1p19 sont les suivants:

(i) elle est à la fois extrêmement bien conservée au sein d'une même espèce et suffisamment divergente entre des espèces différentes

pour permettre de produire facilement des réactifs spécifiques d'espèce. Aucune réaction croisée n'a été observée entre les anticorps dérivés de PfMSP1p19 et PvMSP1p19 ;

5 (ii) la fonction du MSP1p19, bien que non connue avec précision, semble être suffisamment importante pour que cette molécule ne varie pas de façon significative ou soit déléetée sans effet létal pour le parasite ;

(iii) c'est un antigène majeur se trouvant sur tous les mérozoïtes et donc, il doit être, en principe, détectable même à basse parasitémie et proportionnellement à la parasitémie ;

10 (iv) puisque les molécules recombinantes de MSP1p19 dérivées de baculovirus semblent reproduire davantage la structure native de MSP1p19, les anticorps produits contre ces protéines seraient bien adaptés à un usage diagnostique.

15 Les microorganismes identifiés ci-dessous ont été déposés suivant la règle 6.1. du Traité de Budapest à la date du 01 février 1996, sous les numéros suivants :

<u>Références d'identification</u>	<u>Numéros d'enregistrement</u>
PvMSP1p19A	I - 1659
20 PvMSP1p19S	I - 1660
PfMSP1p19A	I - 1661
PfMSP1p19S	I - 1662
PcMSP1p19S	I - 1663

25 L'invention concerne également l'utilisation de ces anticorps, alors de préférence préalablement fixés sur un support solide (par exemple pour chromatographie d'affinité), pour la purification de peptides du type p19 initialement contenus dans un mélange.

30 La purification fait alors intervenir une mise en contact de ce mélange avec l'anticorps, la dissociation du complexe antigène-anticorps et la récupération du peptide de type p19 purifié.

REFERENCES

- 5 (1) Holder, J.A. et al. (1982) « Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody ». J. Exp. Med. **156** : 1528-1538.
- (2) Howard, R. et al. (1984) « Localization of the major *Plasmodium falciparum* glycoprotein on the surface of mature intracellular trophozoites and schizonts ». Mol. Biochem. Parasitol. **11** : 349-362.
- 10 (3) Pirson, P. et al. (1985) « Characterization with monoclonal antibodies of a surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites ». J. Immunol. **134** : 1946-1951.
- (4) Aley, S.B. et al. (1987) « *Plasmodium vivax*: Exoerythrocytic schizonts recognized by monoclonal antibodies against blood-stage schizonts ». Exp. Parasitol. **64** : 188-194.
- 15 (5) Holder, A.A. (1988) « The precursor to major merozoite surface antigen: structure and role in immunity ». Prog. Allergy **41** : 72-97.
- (6) Cooper, J.A. (1993) « Merozoite surface antigen-1 of *Plasmodium* ». Parasitol. Today **9** : 50-54.
- 20 (7) Holder, A.A., et al. (1987) « Processing of the precursor to the major merozoite antigens of *Plasmodium falciparum* » Parasitology **94** : 199-208.
- 25 (8) Lyon, J.A. et al. (1986) « Epitope map and processing scheme for the 195 000-dalton surface glycoprotein of *Plasmodium falciparum* merozoites deduced from cloned overlapping segments of the gene ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 2989-2993.
- 30 (9) Blackman, M.J. et al. (1992) « Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP1₃₃ as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSOP1 ». Mol. Biochem. Parasitol. **50** : 307-316.

- (10) Haldar, K., et al. (1985) « Acylation of a *Plasmodium falciparum* merozoïte surface antigen via sn-1,2-diacyl glycerol. ». J. Biol. Chem. 260 : 4969-4974.
- (11) Braun Breton, C. et al. (1990) « Glycolipid anchorage of *Plasmodium falciparum* surface antigens ». Res. Immunol. 141 : 743-755.
- (12) Kumar, S. et al. (1995) « Immunogenicity and *in vivo* Efficacy of Recombinant *Plasmodium falciparum* Merozoïte surface protein-1 in *Aotus* Monkeys ». Molecular Medicine, Vol. 1, 3 : 325-332.
- (14) Longacre, S. et al. (1994) « *Plasmodium vivax* merozoïte surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus ». Mol. Biochem. Parasitol. 64 : 191-205.
- (15) McBride, J.S. et al. (1987) « Fragments of the polymorphic Mr 185 000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoïtes form an antigenic complex ». Mol. Biochem. Parasitol. 23 : 71-84.
- (16) Blackman, M.J. et al. (1990) « A single fragment of a malaria merozoïte surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies ». J. Exp. Med. 172 : 379-382.
- (17) Kaslow, D.C. et al. (1994) « Expression and antigenicity of *Plasmodium falciparum* major merozoïte surface protein (MSP1₁₉) variants secreted from *Saccharomyces cerevisiae* ». Mol. biochem. Parasitol. 63 : 283-289.
- (18) Chang, S.P., et al. (1992) « A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth ». J. Immunol. 149 : 548-555.
- (19) Longacre, S. (1995) « The *Plasmodium cynomolgi* merozoïte surface protein 1 C-terminal sequence and its homologies with other *Plasmodium* species ». Mol. Biochem. Parasitol. 74 : 105-111.

- (20) Del Portillo, H.A., et al. (1990) « Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88** : 4030-4034.
- 5 (21) Gibson, H.L., et al. (1992) « Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax* ». Mol. biochem. Parasitol. **50** : 325-334.
- (22) Dissanaïke, A.S., et al. (1965) « Two new malaria parasites, *Plasmodium cynomolgi ceylonensis* sub sp. nov. and *Plasmodium fragile* sp. nov. from monkeys in Ceylon ». Ceylon Journal of Medical
10 Science **14** : 1-9.
- (23) Cochrane, A.H., et al. (1986) « Further studies on the antigenic diversity of the circumsporozoite proteins of the *Plasmodium cynomolgi* complex. ». Am. J. Trop. Med. Hyg. **35** : 479-487.
- 15 (24) Naotunne, T. de S., et al. (1990) « *Plasmodium cynomolgi*: serum-mediated blocking and enhancement of infectivity to mosquitos during infections in the natural host, *Macaca sinica* ». Exp. Parasitol. **71**, 305-313.
- (25) Ihalamulla, R.L. et al. (1987) « *Plasmodium vivax*: isolation of mature asexual stages and gametocytes from infected human blood by colloidal silica (Percoll) gradient centrifugation ». Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **81** : 25-28.
20
- (26) Kimura, E., et al. (1990) « Genetic diversity in the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: high prevalence of a third polymorphic form detected in strains derived in strains derived from
25 malaria patients ». Gene **91** : 57-62.
- (27) Heidrich, H.-G., et al. (1989) « The N-terminal amino acid sequences of the *Plasmodium falciparum* (FCBI) merozoite surface antigen of 42 and 36 kilodalton, both derived from the 185-195 kilodalton precursor ». Mol. Biochem. Parasitol. **34** : 147-154.
30

- (28) Blackman, M.J., et al. (1991) « Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains ». Mol. Biochem. Parasitol. **49** : 29-34.
- 5 (29) Adams, J.M. et al. (1992) « A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites ». Proc. Natl. Acad. Sci, **89**:7085-7089.
- (30) Sim B.K.L. (1995) « EBA-175: An erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium falciparum* ». Parasitology Today, vol.II, n°6:213-217.
- (31) Sim B.K.L. (1994) « Receptor and ligand domains for invasion of
10 erythrocytes by *Plasmodium falciparum* ». Science, **264**:1941-1944.
- (32) Davies, A. et al. (1993), Biochem J. **295** (Pt3) : 889-896. « Expression of the glycosylphosphatidylinositol-linked complement-inhibiting protein CD59 antigen in insect cells using a baculovirus vector ».
- (33) Haziot A. et al. (1994) J. Immunol. **152** : 5868. « Recombinant soluble
15 CD14 Inhibits LPS-Induced Tumor Necrosis Factor & Production by Cells in Whole Blood ».

REVENDICATIONS

5 1. Protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, autre que *Plasmodium vivax*, et infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
 - soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
 - soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et
- cette protéine recombinante comportant le cas échéant des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

25 2. Protéine recombinante selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence polypeptidique C-terminale de la p33 (fragment N-terminal de 33 kDa) normalement du côté associé à la p19 dans la p42 correspondante, avant le clivage naturel de cette dernière, cette dernière séquence polypeptidique C-terminale de la p33 comportant, lorsqu'elle est présente, moins de 50 résidus d'acides aminés.

30

3. Protéine recombinante selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence polypeptidique du côté C-terminal de la p33 (fragment N-terminal de 33 kDa) normalement associée à la p19 dans la p42 correspondante avant le clivage naturel de cette dernière, cette dernière séquence polypeptidique C-terminale de la p33, comportant, lorsqu'elle est présente, moins de 35, voire même moins de 10 résidus d'acides aminés.

4. Protéine recombinante selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence polypeptidique du côté C-terminal de la p33 (fragment N-terminal de 33 kDa) normalement associée à la p19 dans la p42 correspondante avant le clivage naturel de cette dernière, cette dernière séquence polypeptidique C-terminale de la p33 étant limitée, lorsqu'elle est présente, à celle qui conserve un degré de conservation substantiel dans les *Plasmodium* infectieux pour l'homme, tels que *P.falciparum* ou *P.vivax*.

5. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la partie de fragment p19 contient au moins l'une des deux régions EGF normalement contenues dans cette p19.

6. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le poids moléculaire de ce fragment p19 ou de cette partie de fragment p19 est comprise entre 10 et 25 kDa, notamment entre 10 et 15 kDa.

7. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comporte également un groupe glycosylphosphatidylinositol (GPI) du type de ceux qui permettent un ancrage du fragment p19 à l'hôte cellulaire, notamment une cellule eucaryote, préférentiellement une cellule d'insecte infectable par un baculovirus, dans lequel ladite protéine recombinante est exprimée.

8. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est dépourvue de la partie C-terminale extrême hydrophobe qui intervient dans l'induction de l'ancrage de cette protéine recombinante à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule eucaryote, préférentiellement une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

9. Protéine recombinante selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle est hydrosoluble.

10. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle contient la séquence de la p19 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium falciparum* ou ladite partie du fragment correspondant.

11. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle contient la séquence de la p19 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium cynomolgi* ou ladite partie du fragment correspondant.

12. Oligomère de la protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

13. Oligomère selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il contient de 2 à 50 unités monomère de ladite séquence polypeptidique de la protéine recombinante telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 11.

14. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle est conjuguée à une molécule porteuse utilisable pour la production de vaccins.

15. Composition vaccinale contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif une protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;

- soit d'une partie de ce fragment ^{Induire une réponse immunitaire capable d'} dès lors qu'elle est apte aussi à ~~inhiber~~ ^{due au} une parasitémie ~~normalement induite~~ in vivo ~~par le~~ parasite correspondant ;

- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

16. Composition vaccinnante selon la revendication 15, caractérisée en ce que son principe actif consiste en une protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 2 à 11 ou 14, ou en un oligomère selon la revendication 12 ou 13.

17. Composition vaccinnante contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif un oligomère d'une protéine recombinante selon la revendication 15 ou la revendication 16.

18. Anticorps polyclonal reconnaissant sélectivement la p19 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaît pas *Plasmodium vivax*.

19. Anticorps monoclonal selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il ne reconnaît pas *Plasmodium vivax*.

20. Anticorps monoclonal selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P.falciparum*.

21. Anticorps monoclonal selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P.vivax*.

5 22. Procédé de diagnostic différentiel permettant de distinguer entre une infection parasitaire due à *P.vivax*, d'une part, et une infection parasitaire due à un autre *Plasmodium*, d'autre part, caractérisé par les mises en contact d'un prélèvement biologique infecté par un *Plasmodium* avec un anticorps selon la revendication 21, d'une part, et avec un
10 anticorps selon la revendication 19 ou 20, d'autre part, et la détection selon le cas, de la production ou non d'une réaction immunologique.

23. Vecteur modifié du type baculovirus recombinant contenant sous le contrôle d'un promoteur contenu dans ce vecteur et susceptible d'être reconnu par des cellules transfectables par ce vecteur, une première
15 séquence nucléotidique codant pour un peptide signal compatible avec l'expression dans un système baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et dont au moins une partie code pour la séquence peptidique :

- soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la
20 protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* autre que *Plasmodium vivax* et infectieux pour l'homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- 25 • soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;

- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

ladite séquence nucléotidique ayant en outre une teneur en G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% de la totalité des nucléotides dont elle est constituée.

24. Vecteur modifié selon la revendication 23, caractérisé en ce que la susdite deuxième séquence polypeptidique est conforme à celle définie dans l'une quelconque des revendications 2 à 11.

25. Vecteur modifié selon la revendication 23, caractérisé en ce que la deuxième séquence nucléotidique est une séquence synthétique.

26. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 23 à 25, caractérisé en ce que la première séquence nucléotidique code pour un peptide signal issu de *Plasmodium vivax* et normalement associé à la protéine MSP-1 de ce *Plasmodium*.

27. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 23 à 26, caractérisé en ce que la deuxième séquence nucléotidique est dépourvue à son extrémité 3' terminale de la séquence d'extrémité C-terminale hydrophobe qui est impliquée dans l'induction de l'ancrage de cette protéine recombinante à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

28. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 23 à 27, caractérisé en ce qu'il consiste en un baculovirus modifié.

29. Organisme, notamment cellule d'insecte du type Sf9, transfectable et transfecté par le vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 23 à 27.

30. ADN synthétique contenant une première séquence nucléotidique dont au moins une partie code pour la séquence peptidique :

- soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte *Plasmodium falciparum*, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de cet ADN ^{induire une réponse immunitaire capable d'} dans un système baculovirus est apte à inhiber une parasitémie ~~normalement induite in vivo~~ ^{due au} parasite correspondant ;
- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et ladite séquence nucléotidique ayant en outre une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% du total des nucléotides dont est constitué le susdit ADN synthétique.

31. ADN synthétique selon la revendication 30, caractérisé en ce que sa première séquence nucléotidique est dépourvue à son extrémité 3' terminale de la séquence codant pour la région d'extrémité C-terminale hydrophobe normalement impliquée dans l'induction de l'ancrage de la protéine p19 à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

32. ADN synthétique selon la revendication 30 ou la revendication 31, caractérisé en ce que la première séquence nucléotidique est précédée d'une séquence nucléotidique signal codant pour un peptide signal normalement associé à une protéine MSP-1 de *Plasmodium*, homologue ou hétérologue vis-à-vis de la séquence principale.

33. ADN synthétique selon la revendication 32, caractérisé en ce que la séquence signal est issue de *P. vivax*.

34. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 30 à 33, caractérisé en ce que la susdite première séquence nucléotidique inclut une séquence 3'-terminale codant pour une région polypeptidique d'ancrage à la membrane cellulaire, ladite région d'ancrage se fixant sur la protéine recombinante exprimée à la surface de la membrane de l'hôte cellulaire transformé avec un vecteur contenant ledit ADN synthétique, ladite séquence 3' étant homologue à celle de la séquence nucléotidique principale, ou hétérologue, notamment celle issue de *P.vivax*.

35. ADN synthétique selon la revendication 34, caractérisé en ce que la séquence 3'-terminale est issue de *P.vivax*.

36. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 30 à 34, caractérisé en qu'il est dépourvu de ladite séquence 3'-terminale.

37. Vecteur de type baculovirus selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1659
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1660
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1661
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1662
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1663.

38. Hybridome sécréteur d'anticorps monoclonaux ayant les spécificités des anticorps selon l'une quelconque des revendications 18 à 21.

39. Procédé de séparation d'un peptide p19 de spécificité donnée à partir d'un mélange de peptides, caractérisé par la mise en contact de ce mélange de peptides avec un anticorps correspondant, conforme à l'une quelconque des revendications 18 à 21, de préférence préalablement fixé sur un support insoluble, par la dissociation ultérieure du composé antigène-anticorps formé et par la récupération du peptide p19 purifié.

40. Utilisation de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 ou de l'oligomère selon la revendication 13 ou 14 pour la préparation d'une composition immunogène susceptible d'induire une réponse immune contre une infection à *Plasmodium*.

Bac 19	E	F	N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N
	GAA	TTC	AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC
PF 19																	
	AAC	ATT	TCA	CAA	CAC	CAA	TGC	GTA	AAA	AAA	CAA	TGT	CCA	GAA	AAT		
Bac 19	S	G	C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L
	TCT	GGC	TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG
PF 19																	
	TCT	GGA	TGT	TTC	AGA	CAT	TTA	GAT	GAA	AGA	GAA	GAA	TGT	AAA	TGT	TTA	TTA
Bac 19	N	Y	K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C
	AAC	TAC	AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT
PF 19																	
	AAT	TAC	AAA	CAA	GAA	GGT	GAT	AAA	TGT	GTT	GAA	AAT	CCA	AAT	CCT	ACT	TGT
Bac 19	N	E	N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D
	AAC	GAG	AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC
PF 19																	
	AAC	GAA	AAT	AAT	GGT	GGA	TGT	GAT	GCA	GAT	GCC	AAA	TGT	ACC	GAA	GAA	GAT
Bac 19	S	G	S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S
	TCG	GGC	AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG
PF 19																	
	TCA	GGT	AGC	AAC	GGA	AAG	AAA	ATC	ACA	TGT	GAA	TGT	ACT	AAA	CCT	GAT	TCT
Bac 19	Y	P	L	F	D	G	I	F	C	S	*	*					
	TAC	CCG	CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA					
PF 19																	
	TAT	CCA	CTT	TTC	GAT	GGT	ATT	TTC	TGC	AGT							

Fig. 1A

Fig. 1B

	E	F	N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N
Bac 19	<u>GAA TTC</u>	AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC	
PF 19	site E ₂ RI																
		AAC	ATT	TCA	CAA	CAC	CAA	TGC	GTA	AAA	AAA	CAA	TGT	CCA	GAA	AAT	
	S	G	C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L
Bac 19	TCT	GGC	TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG
PF 19																	
	TCT	GGA	TGT	TTC	AGA	CAT	TTA	GAT	GAA	AGA	GAA	GAA	TGT	AAA	TGT	TTA	TTA
	N	Y	K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C
Bac 19	AAC	TAC	AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT
PF 19																	
	AAT	TAC	AAA	CAA	GAA	GGT	GAT	AAA	TGT	GTT	GAA	AAT	CCA	AAT	CCT	ACT	TGT
	N	E	N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D
Bac 19	AAC	GAG	AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC
PF 19																	
	AAC	GAA	AAT	AAT	GGT	GGA	TGT	GAT	GCA	GAT	GCC	AAA	TGT	ACC	GAA	GAA	GAT
	S	G	S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S
Bac 19	TCG	GGC	AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG
PF 19																	
	TCA	GGT	AGC	AAC	GGA	AAG	AAA	ATC	ACA	TGT	GAA	TGT	ACT	AAA	CCT	GAT	TCT
	Y	P	L	F	D	G	I										
Bac 19	TAC	CCG	CTG	TTC	GAC	GGC	ATC										
PF 19																	
	TAT	CCA	CTT	TTC	GAT	GGT	ATT										

va. F C S S S N F L G I
 19 TTC TGC AGC TCC TCT AAC TTC TTG GGC ATC
 19 TTC TGC AGT TCC TCT AAC TTC TTA GGA ATA
 ~ S F L L I L M L I
 19 TCG TTC TTG TTG ATC CTC ATG TTG ATC
 19 TCA TTC TTA TTA ATA CTC ATG TTA ATA
 a L V S F
 19 TTG TAC AGC TTC ATT * *
 19 TTA TAC AGT TTC ATT TAA TAA

ATG	AAG	GCG	CTA	CTC	TTT	TTG	TTC	TCT	TTC	ATT	TTT	TTC	GTT	ACC	AAA	TGT
M	K	A	L	L	F	L	F	S	F	I	F	F	V	T	K	C
CAA	TGT	GAA	ACA	GAA	AGT	TAT	AAG	CAG	CTT	GTA	GCC	AAC	GTG	GAC	GAA	TTC
Q	C	E	T	E	S	Y	K	Q	L	V	A	N	V	D	<u>E</u>	<u>F</u>
AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC	TCT	GGC
N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N	S	G
TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG	AAC	TAC
C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L	N	Y
AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT	AAC	GAG
K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C	N	E
AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC	TCG	GGC
N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D	S	G
AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG	TAC	CCG
S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S	Y	P
CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA							
L	F	D	G	I	F	C	S	*	*							

FIGURE 1C

Fig. 2

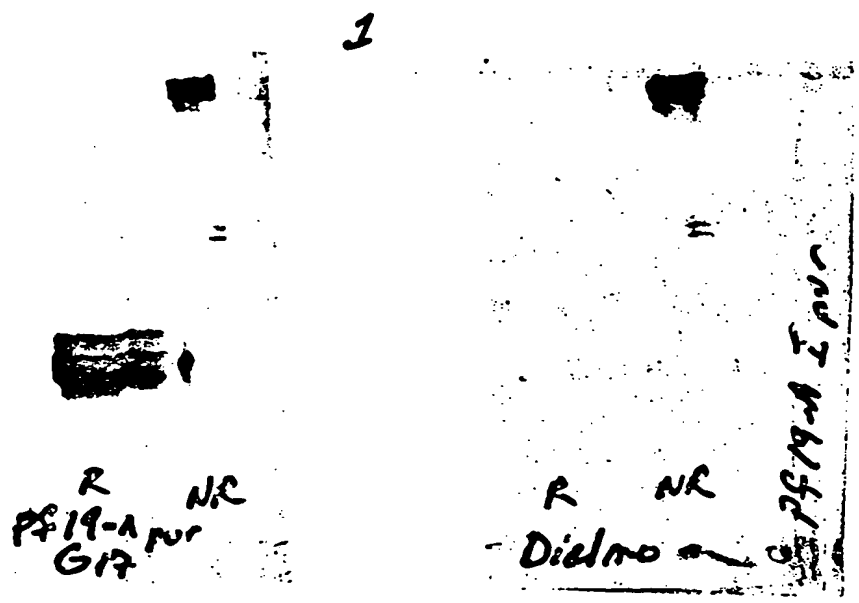
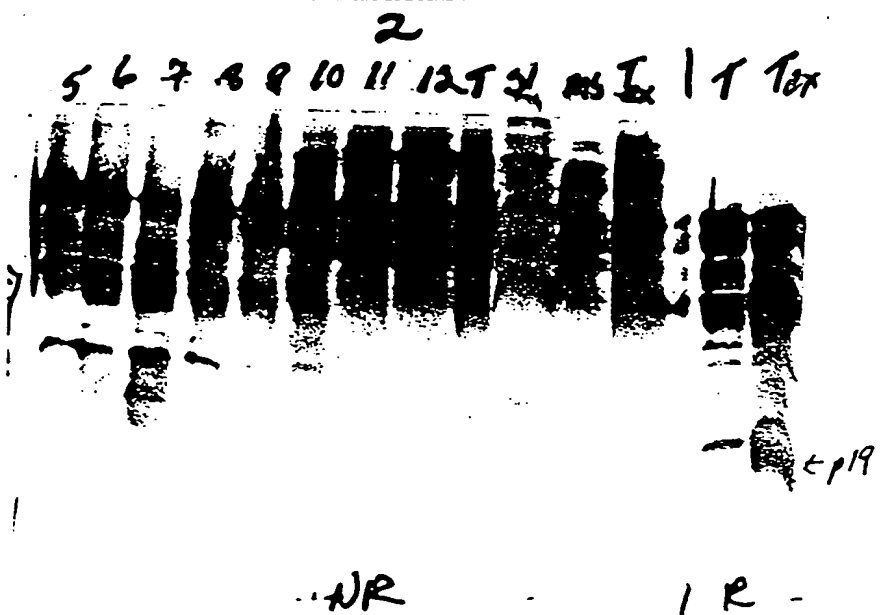


Fig. 3



cynomolg
 vivax(Belem)
 vivax(Sal-1)
 Consensus

DCVTTGGEAES EAPEILVPCG INEYOVVY~ PLAGMYKTIK KPLENHVNAF NTNIDMLD ALKKANYFLO VLNSOLNPYS IPHSGEYIIK
 DOVTTGGEAES EAPEILVPAG ISOYOVVY~ PLAGMYKTIK KOLENHVNAF NTNIDMLD ALKKANYFLE VLNSOLNPFK YSPSGEYIIK
 DOVTTGGEAES EAPEILVPAG ISOYOVVY~ PLAGMYKTIK KOLENHVNAF NTNIDMLD ALKKANYFLE VLNSOLNPFK YSPSGEYIIK
 DOVTTGGEAES EAPEILVPAG ISOYOVVY~ PLAGMYKTIK KOLENHVNAF NTNIDMLD ALKKANYFLE VLNSOLNPFK YSPSGEYIIK

REGION I

42

cynomolg
 vivax(Belem)
 vivax(Sal-1)
 Consensus

OPYKLLLOLE KKKLGGSYKY IGASVOTOMV TANDGLAYYO KMGOLYKKHU DEVNACQKEV EAININCHDEE KKKLGGSEAST ANOKTCINAK
 OPYKLLLOLE KKKLGGSYKY IGASVOTOMV TANDGLAYYO KMGOLYKKHU TAVNIEEVKKV EADIKAEODK KKKLGGSEAST TTEKTCINAK
 OPYKLLLOLE KKKLGGSYKY IGASVOTOMV TANDGLAYYO KMGOLYKKHU TAVNIEEVKKV EADIKAEODK KKKLGGSEAST TTEKTCINAK
 OPYKLLLOLE KKKLGGSYKY IGASVOTOMV TANDGLAYYO KMGOLYKKHU TAVNIEEVKKV EADIKAEODK KKKLGGSEAST TTEKTCINAK

REGION II

181

cynomolg
 vivax(Belem)
 vivax(Sal-1)
 Consensus

KEELOKYLPP LSSIOKEYST LVNKVHSYTO TLKKIINNCO IEKKTETITV NKLEDYSKMO EELDVKYKSK KEDDVKSSGL LEKLMNSKLI
 KAELEKYLPP LNSLOKEYES LVSKVNTYTO NLKKVINNCO LEKKEAEITV KKLODYNNKMO EKLEEVKKSE KNEVKSSGL LEKLMNSKLI
 KAELEKYLPP LNSLOKEYES LVSKVNTYTO NLKKVINNCO LEKKEAEITV KKLODYNNKMO EKLEEVKKSE KNEVKSSGL LEKLMNSKLI
 K-EL-KYLPP L-S-OKEY.. LV-KV..YTD -LKK-INNCO -EKKE-E..V -KL-DY-KMO E-L..YK-S-K...VKSSGL LEKLMNSKLI

REGION III

271

cynomolg
 vivax(Belem)
 vivax(Sal-1)
 Consensus

NOESKXKALS ELUNVOTOML MSSEHRCID TNVPENAACY RYLOGTEEWA CLLYFKEDAG KCVPAFNTTC KOKNGGCAPE AECKMNDKNE
 KENESKEILS OLUNVOTOLL TMSSEHTCID TNVPONAACY RYLOGTEEWA CLLYFKEDAG KCVPAFNTTC KOKNGGCAPE AECKMNDKNE
 KENESKEILS OLUNVOTOLL TMSSEHTCID TNVPONAACY RYLOGTEEWA CLLYFKEDAG KCVPAFNTTC KOKNGGCAPE AECKMNDKNE
 ...ESK...LS -LUNVOTQ-L -MSSEH-CID TNVP-NAACY RYLOGTEEWA CLL-FKE--G KCVPA-N-TC KD-NGGCAPE AECKMNDKNE

REGION IV

361

cynomolg
 vivax(Belem)
 vivax(Sal-1)
 Consensus

IVCKCTKEGS EPLFEGVFCS
 IVCKCTKEGS EPLFEGVFCS
 IVCKCTKEGS EPLFEGVFCS
 IVCKCTKEGS EPLFEGVFCS

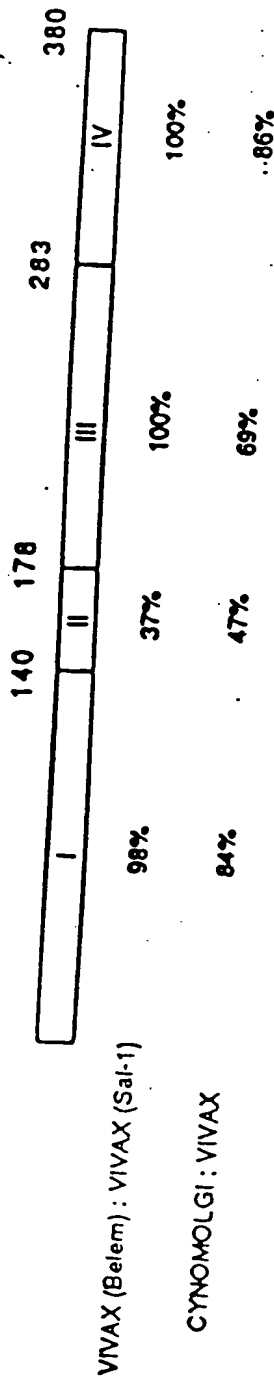
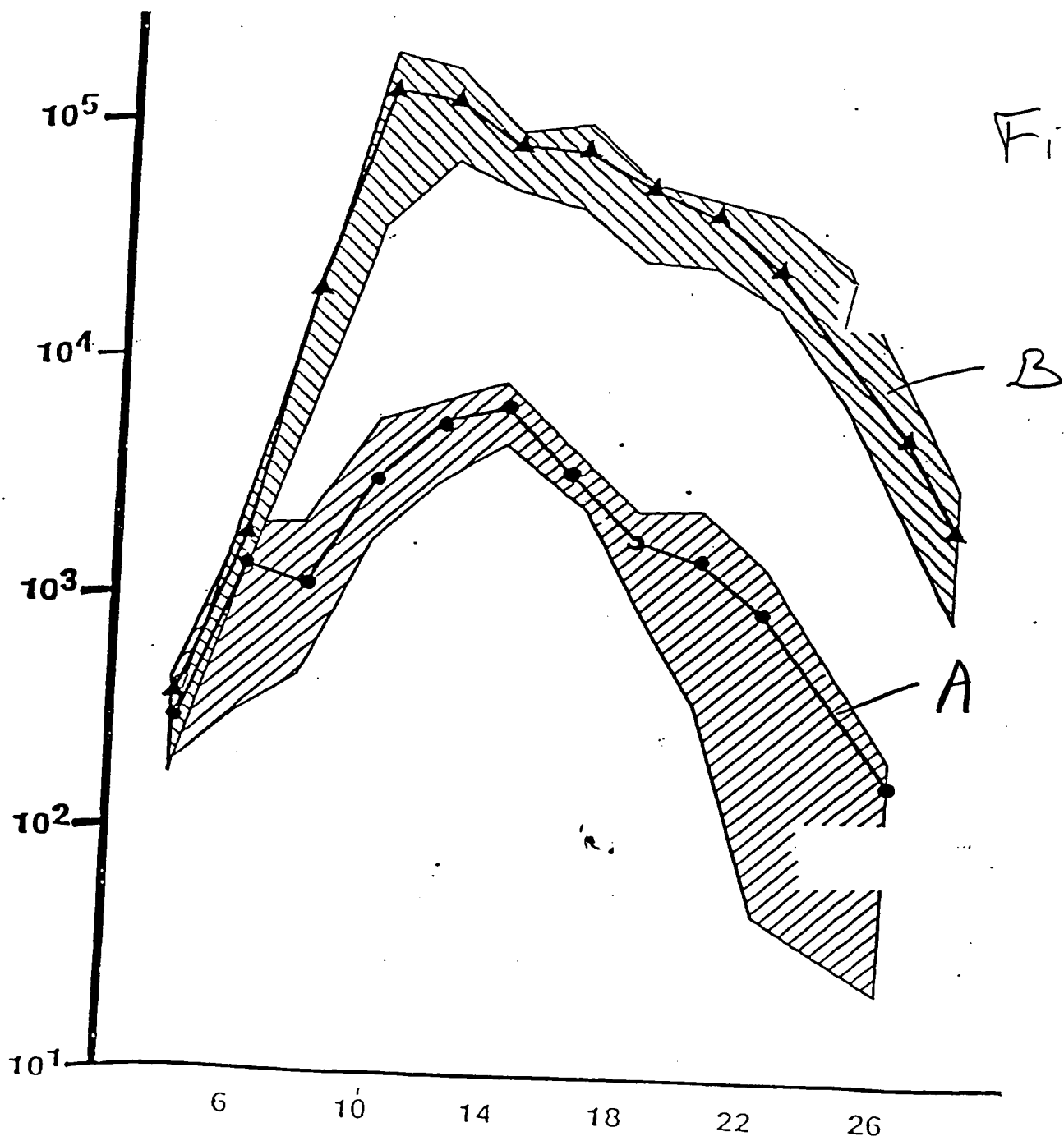
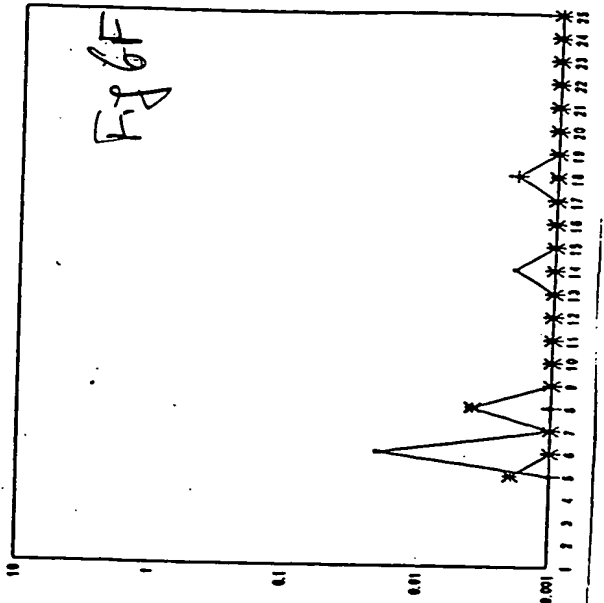
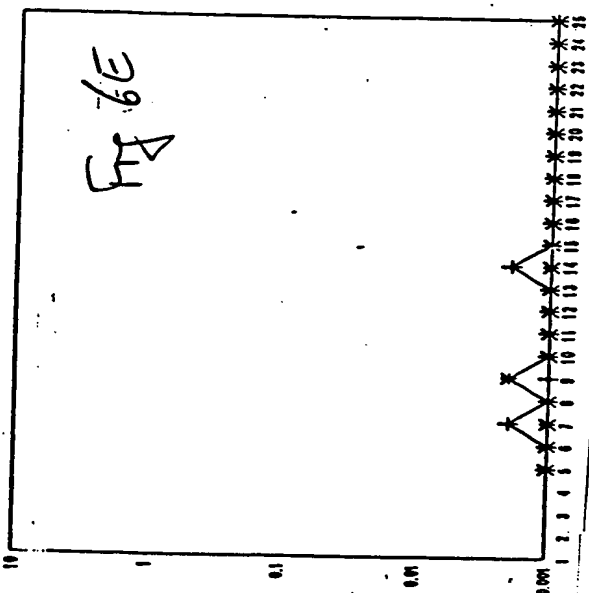
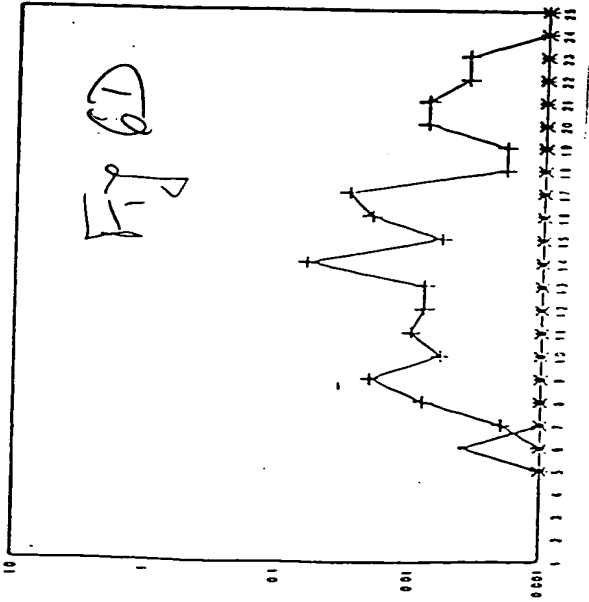
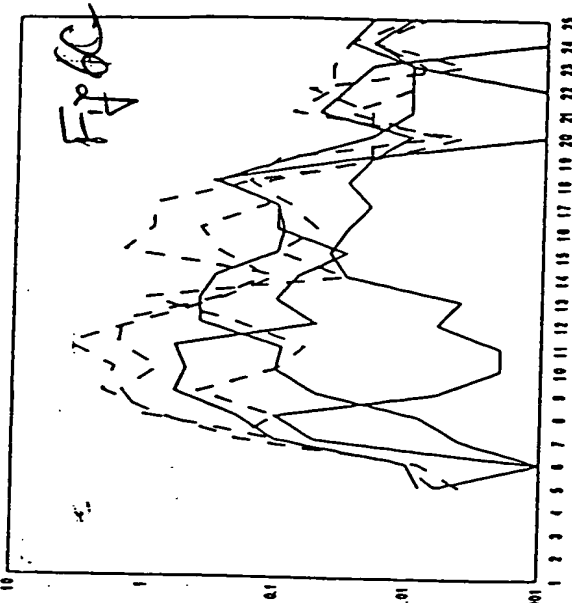
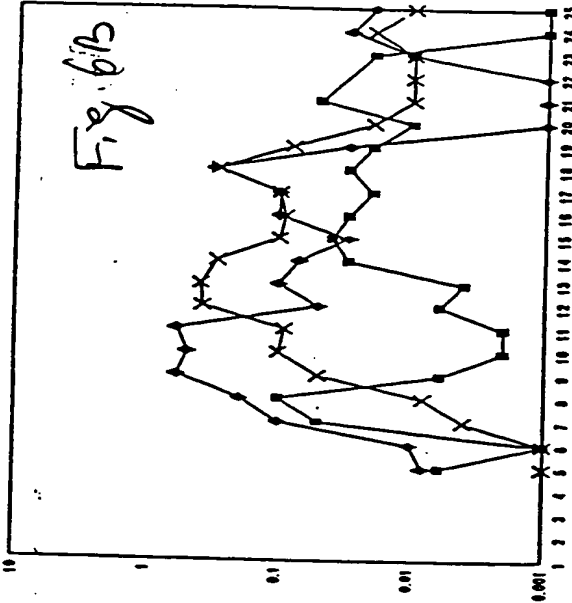
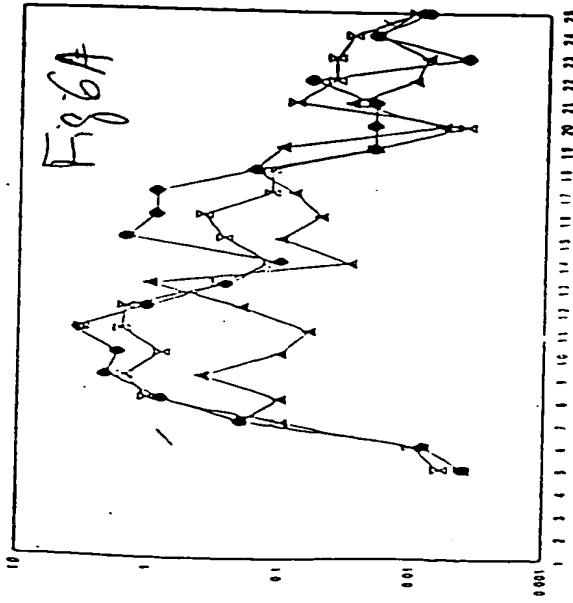


Fig. 4





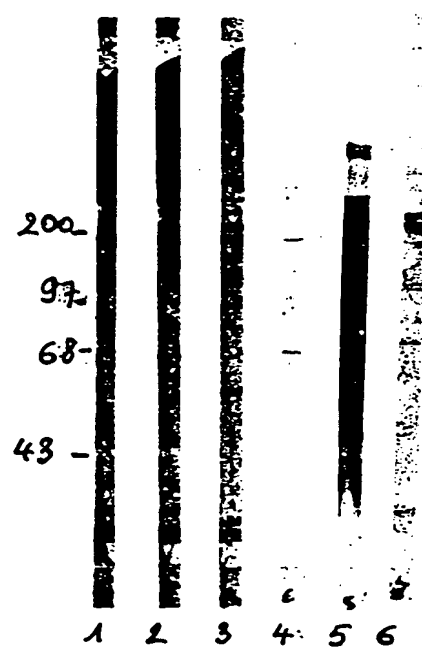


FIGURE 7

**PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT UN FRAGMENT
C-TERMINAL DE LA PROTEINE MSP-1
D'UN *PLASMODIUM* INFECTIEUX POUR L'HOMME
POUR LA PRODUCTION DE VACCINS ANTI-PALUDIQUES**

5

L'invention concerne de nouveaux principes actifs de vaccins dérivés de la protéine majeure de surface de formes mérozoïtes d'un *Plasmodium* infectieux pour l'homme, plus généralement connue sous la désignation MSP-1.

10

Cette protéine a déjà fait l'objet d'études nombreuses. Elle est synthétisée dans le stade schizonte des parasites du type *Plasmodium*, notamment *Plasmodium falciparum*, et est exprimée sous forme de l'un des constituants majeurs de la surface des mérozoïtes aussi bien pendant le stade hépatique que pendant le stade érythrocytaire du paludisme (1, 2, 3, 4). En raison du caractère prédominant et de la conservation dans toutes les espèces de *Plasmodium* connues de cette protéine, il a été suggéré qu'elle pourrait représenter un candidat pour la constitution de vaccins anti-paludiques (5, 6).

15

20

Il en a encore été de même pour des fragments de cette protéine, particulièrement des produits naturels de clivage dont l'on observe la formation, par exemple au cours de l'invasion par le parasite des érythrocytes de l'hôte infecté. Parmi, ces produits de clivage, on relèvera le fragment C-terminal ayant un poids moléculaire de 42 kDa (7,8) qui est à son tour clivé une nouvelle fois en un fragment N-terminal ayant un poids moléculaire apparent conventionnel de 33 kDa et en un fragment C-terminal ayant un poids moléculaire apparent conventionnel de 19 kDa (9) qui reste normalement fixé à la membrane du parasite au terme des modifications dont il est lui-même l'objet, par l'intermédiaire de groupes du type glycosylphosphatidylinositol (GPI) (10, 11).

25

30

- soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- soit d'un peptide immunologiquement équivalent à ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant, de préférence, la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

La présence de ces épitopes conformationnels pourrait jouer un rôle important dans l'efficacité protectrice du principe actif de vaccins. On les retrouve tout particulièrement dans les principes actifs présentant par ailleurs les autres caractéristiques définies ci-dessus, lorsqu'ils ont été produits dans un système vecteur baculovirus. S'il en est besoin, il est mentionné ci-après que par l'expression « système de vecteur baculovirus » on entend l'ensemble que constitue le vecteur type baculovirus lui-même et les lignées cellulaires, notamment cellules d'insectes transfectables par un baculovirus modifié par une séquence à transférer dans ces lignées cellulaires avec pour résultat l'expression de cette séquence transférée. Des exemples préférés de ces deux partenaires du système baculovirus, ont été décrits dans l'article de Longacre et al. (19). C'est le même système qui a été utilisé dans les exemples qui suivent. Il va naturellement de soi que des variants, tant du baculovirus que des cellules infectables par ce baculovirus peuvent être utilisés en lieu et place de celui qui a été choisi.

Le caractère instable en milieu réducteur de ces épitopes conformationnels peut être mis en évidence, notamment par le test décrit plus loin dans les exemples, notamment en présence de β -mercaptoéthanol.

De ce point de vue, la protéine recombinante produite par S. Longacre et al. (14) peut être mise en oeuvre dans de tels compositions.

baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence nucléotidique en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et code pour la séquence peptidique :

- 5 • soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* autre que *Plasmodium vivax* et infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- 10 • soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- 15 • soit d'un peptide immunologiquement équivalent dérivé du susdit fragment peptidique C-terminal (p19) ou de la susdite partie de fragment peptidique par addition, délétion ou substitution d'acides aminés n'entraînant pas une modification importante de la capacité de ce peptide immunologiquement équivalent à induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale semblable à celle
- 20 produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

ladite séquence nucléotidique ayant le cas échéant une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% de la totalité des nucléotides dont elle est constituée. Cette séquence

25 peut être obtenue par construction d'un gène synthétique dans lequel les codons naturels ont été changés par des codons riches en G/C sans que leur traduction soit modifiée (maintien de la séquence peptidique).

En l'occurrence ladite séquence nucléotidique, fournie par un ADN synthétique, peut présenter au moins 10% de codons modifiés par rapport

30 à la séquence du gène ou du cDNA naturel tout en conservant les

- (33) Hazirot A. et al. (1994) J. Immunol. 152 : 5868. « Recombinant soluble CD14 Inhibits LPS-Induced Tumor Necrosis Factor & Production by Cells in Whole Blood ».
- (34) Chang, S.P. et al., (1988) « *Plasmodium falciparum* : gene structure and hydropathy profile of the major merozoite surface antigen (gp195) of the Uganda-Palo Alto isolate. Exp. Parasitol. 67 : 1-11.
- (35) Holder, A.S. et al. (1985) « Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites, Nature 317 : 270-273.

10 L'invention concerne également les hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques reconnaissant sélectivement la p19 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaissant pas *Plasmodium vivax*.

15 En particulier, ces hybridomes sécrètent des anticorps monoclonaux qui reconnaissent pas la p19 de *Plasmodium vivax* et qui reconnaissent spécifiquement la p19 de *Plasmodium falciparum*.

L'invention concerne également un hybridome caractérisé en ce qu'il produit un anticorps spécifique qui reconnaît spécifiquement la p19 de *P. vivax*.

20

- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

16. Composition vaccinnante selon la revendication 15, caractérisée en ce que son principe actif consiste en une protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 2 à 11 ou 14, ou en un oligomère selon la revendication 12 ou 13.

17. Composition vaccinnante contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif un oligomère d'une protéine recombinante selon la revendication 15 ou la revendication 16.

18. Anticorps reconnaissant sélectivement la p19 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaît pas *Plasmodium vivax*.

19. Anticorps selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il est monoclonal.

20. Anticorps selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il est monoclonal et en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P. falciparum*.

21. Anticorps monoclonal selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P. vivax*.

22. Procédé de diagnostic différentiel permettant de distinguer entre une infection parasitaire due à *P. vivax*, d'une part, et une infection parasitaire due à un autre *Plasmodium*, d'autre part, caractérisé par les mises en contact d'un prélèvement biologique infecté par un *Plasmodium* avec un anticorps selon la revendication 21, d'une part, et avec un anticorps selon la revendication 19 ou 20, d'autre part, et la détection selon le cas, de la production ou non d'une réaction immunologique.

23. Vecteur modifié du type baculovirus recombinant contenant sous le contrôle d'un promoteur contenu dans ce vecteur et susceptible d'être reconnu par des cellules transfectables par ce vecteur, une première séquence nucléotidique codant pour un peptide signal compatible avec l'expression dans un système baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et dont au moins une partie code pour la séquence peptidique :

- soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* autre que *Plasmodium vivax* et infectieux pour l'homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;

- soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte *Plasmodium falciparum*, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de cet ADN dans un système baculovirus est apte à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et ladite séquence nucléotidique ayant en outre une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% du total des nucléotides dont est constitué le susdit ADN synthétique.

31. ADN synthétique selon la revendication 30, caractérisé en ce que sa première séquence nucléotidique est dépourvue à son extrémité 3' terminale de la séquence codant pour la région d'extrémité C-terminale hydrophobe normalement impliquée dans l'induction de l'ancrage de la protéine p19 à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

32. ADN synthétique selon la revendication 30 ou la revendication 31, caractérisé en ce que la première séquence nucléotidique est précédée d'une séquence nucléotidique signal codant pour un peptide signal normalement associé à une protéine MSP-1 de *Plasmodium*, homologue ou hétérologue vis-à-vis de la séquence principale.

33. ADN synthétique selon la revendication 32, caractérisé en ce que la séquence signal est issue de *P. vivax*.

5 34. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 30 à 33, caractérisé en ce que la susdite première séquence nucléotidique inclut une séquence 3'-terminale codant pour une région polypeptidique d'ancrage à la membrane cellulaire, ladite région d'ancrage se fixant sur la protéine recombinante exprimée à la surface de la membrane de l'hôte cellulaire transformé avec un vecteur contenant ledit ADN synthétique, ladite séquence 3' étant homologue à celle de la séquence nucléotidique principale, ou hétérologue, notamment celle issue de *P.vivax*.

10 35. ADN synthétique selon la revendication 34, caractérisé en ce que la séquence 3'-terminale est issue de *P.vivax*.

 36. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 30 à 34, caractérisé en qu'il est dépourvu de ladite séquence 3'-terminale.

15 37. Vecteur de type baculovirus selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1659
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1660
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1661
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1662
- 20 ◦ le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1663.

 38. Hybridome sécréteur d'anticorps monoclonaux ayant les spécificités des anticorps selon l'une quelconque des revendications 19 à 21.

25 39. Procédé de séparation d'un peptide p19 de spécificité donnée à partir d'un mélange de peptides, caractérisé par la mise en contact de ce mélange de peptides avec un anticorps correspondant, conforme à l'une quelconque des revendications 18 à 21, de préférence préalablement fixé sur un support insoluble, par la dissociation ultérieure du composé antigène-anticorps formé et par la récupération du peptide p19 purifié.

30

FIGURE 1A

	E	F	N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N
Bac 19	<u>GAA</u>	<u>TTC</u>	AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC
PF 19			AAC	ATT	TCA	CAA	CAC	CAA	TGC	GTA	AAA	AAA	CAA	TGT	CCA	GAA	AAT
	S	G	C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L
Bac 19	TCT	GGC	TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG
PF 19	TCT	GGA	TGT	TTC	AGA	CAT	TTA	GAT	GAA	AGA	GAA	GAA	TGT	AAA	TGT	TTA	TTA
	N	Y	K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C
Bac 19	AAC	TAC	AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT
PF 19	AAT	TAC	AAA	CAA	GAA	GGT	GAT	AAA	TGT	GTT	GAA	AAT	CCA	AAT	CCT	ACT	TGT
	N	E	N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D
Bac 19	AAC	GAG	AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC
PF 19	AAC	GAA	AAT	AAT	GGT	GGA	TGT	GAT	GCA	GAT	GCC	AAA	TGT	ACC	GAA	GAA	GAT
	S	G	S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S
Bac 19	TCG	GGC	AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG
PF 19	TCA	GGT	AGC	AAC	GGA	AAG	AAA	ATC	ACA	TGT	GAA	TGT	ACT	AAA	CCT	GAT	TCT
	Y	P	L	F	D	G	I	F	C	S	*	*					
Bac 19	TAC	CCG	CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA					
PF 19	TAT	CCA	CTT	TTC	GAT	GGT	ATT	TTC	TGC	AGT							

FIGURE 1B

		<i>Site Eco RI</i>																
		E	F	N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N
Bac 19		<u>GAA</u>	<u>TTC</u>	AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC
PF 19																		
		AAC	ATT	TCA	CAA	CAC	CAA	TGC	GTA	AAA	AAA	CAA	TGT	CCA	GAA	AAT		
		S	G	C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L
Bac 19		TCT	GGC	TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG
PF 19																		
		TCT	GGA	TGT	TTC	AGA	CAT	TTA	GAT	GAA	AGA	GAA	GAA	TGT	AAA	TGT	TTA	TTA
		N	Y	K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C
Bac 19		AAC	TAC	AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT
PF 19																		
		AAT	TAC	AAA	CAA	GAA	GGT	GAT	AAA	TGT	GTT	GAA	AAT	CCA	AAT	CCT	ACT	TGT
		N	E	N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D
Bac 19		AAC	GAG	AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC
PF 19																		
		AAC	GAA	AAT	AAT	GGT	GGA	TGT	GAT	GCA	GAT	GCC	AAA	TGT	ACC	GAA	GAA	GAT
		S	G	S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S
Bac 19		TCG	GGC	AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG
PF 19																		
		TCA	GGT	AGC	AAC	GGA	AAG	AAA	ATC	ACA	TGT	GAA	TGT	ACT	AAA	CCT	GAT	TCT
		Y	P	L	F	D	G	I	F	C	S	S	S	N	F	L	G	I
Bac 19		TAC	CCG	CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TCC	TCT	AAC	TTC	TTG	GGC	ATC
PF 19																		
		TAT	CCA	CTT	TTC	GAT	GGT	ATT	TTC	TGC	AGT	TCC	TCT	AAC	TTC	TTA	GGA	ATA
		S	F	L	L	I	L	M	L	I	L	Y	S	F	I	*	*	
Bac 19		TCG	TTC	TTG	TTG	ATC	CTC	ATG	TTG	ATC	TTG	TAC	AGC	TTC	ATT	TAA	TAA	
PF 19																		
		TCA	TTC	TTA	TTA	ATA	CTC	ATG	TTA	ATA	TTA	TAC	AGT	TTC	ATT			

3/11

ATG	AAG	GCG	CTA	CTC	TTT	TTG	TTC	TCT	TTC	ATT	TTT	TTC	GTT	ACC	AAA	TGT
M	K	A	L	L	F	L	F	S	F	I	F	F	V	T	K	C
CAA	TGT	GAA	ACA	GAA	AGT	TAT	AAG	CAG	CTT	GTA	GCC	AAC	GTG	GAC	GAA	TTC
Q	C	E	T	E	S	Y	K	Q	L	V	A	N	V	D	<u>E</u>	<u>F</u>
AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC	TCT	GGC
N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N	S	G
TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG	AAC	TAC
C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L	N	Y
AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT	AAC	GAG
K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C	N	E
AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC	TCG	GGC
N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D	S	G
AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG	TAC	CCG
S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S	Y	P
CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA							
L	F	D	G	I	F	C	S	*	*							

FIGURE 1C

4/11

GAA	ACA	GAA	AGT	TAT	AAG	CAG	CTT	GTA	GCC	AAC	GTG	GAC	GAA	TTC			
E	T	E	S	Y	K	Q	L	V	A	N	V	D	<u>E</u>	<u>F</u>			
AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC	TCT	GGC	
N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N	S	G	
TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG	AAC	TAC	
C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L	N	Y	
AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT	AAC	GAG	
K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C	N	E	
AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC	TCG	GGC	
N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D	S	G	
AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG	TAC	CCG	
S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S	Y	P	
CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA								
L	F	D	G	I	F	C	S	*	*								

FIGURE 1D

5/11



FIGURE 2

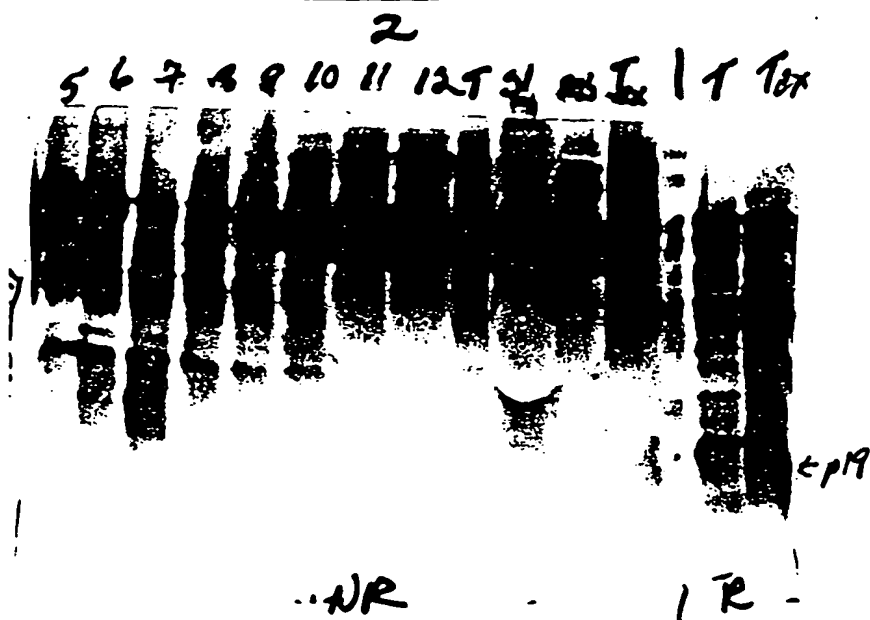


FIGURE 3

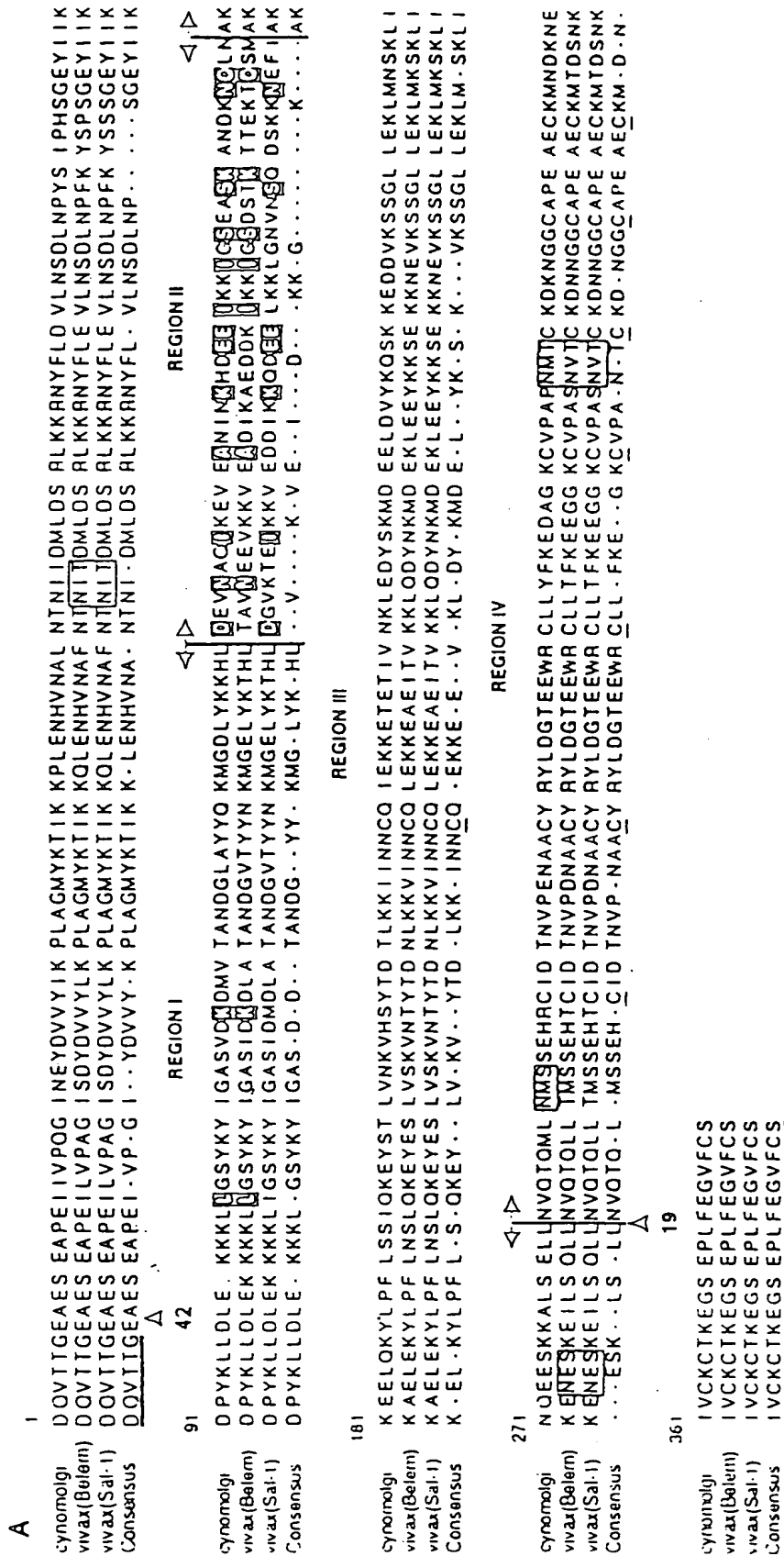


FIGURE 4

7/11

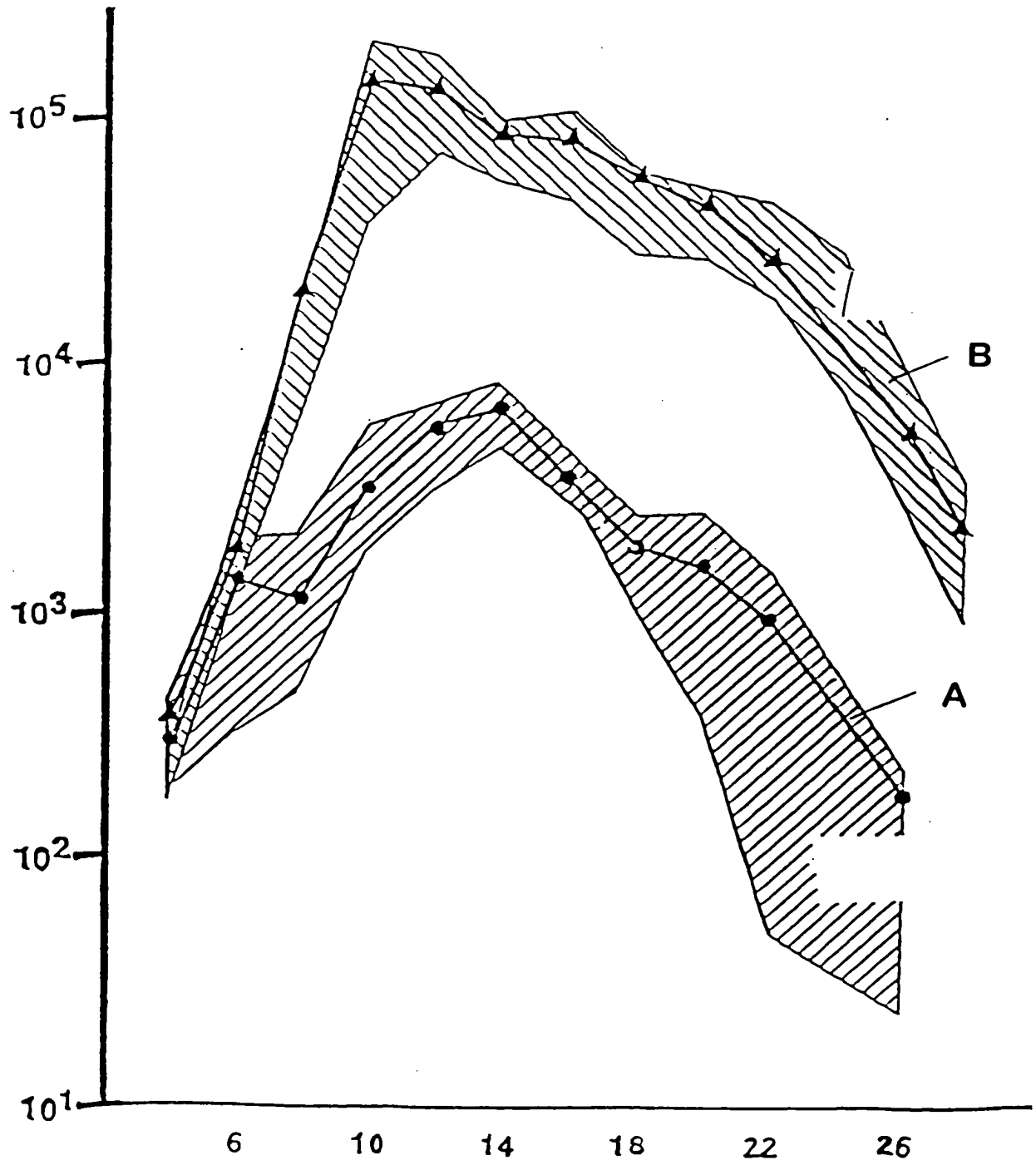


FIGURE 5

8/11

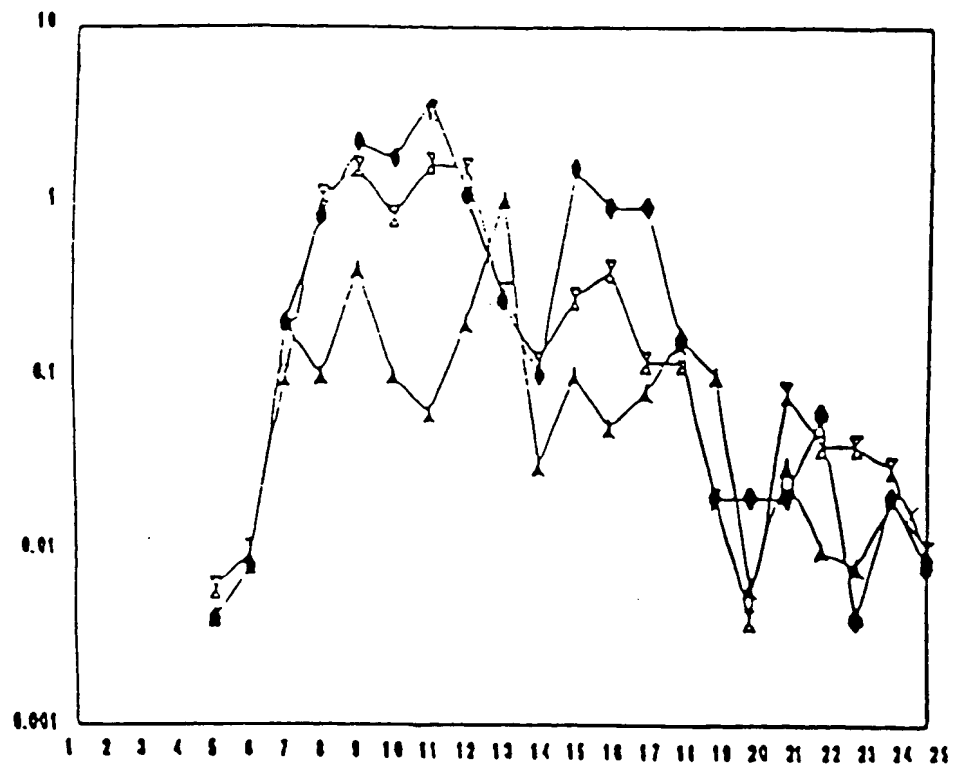


FIGURE 6A

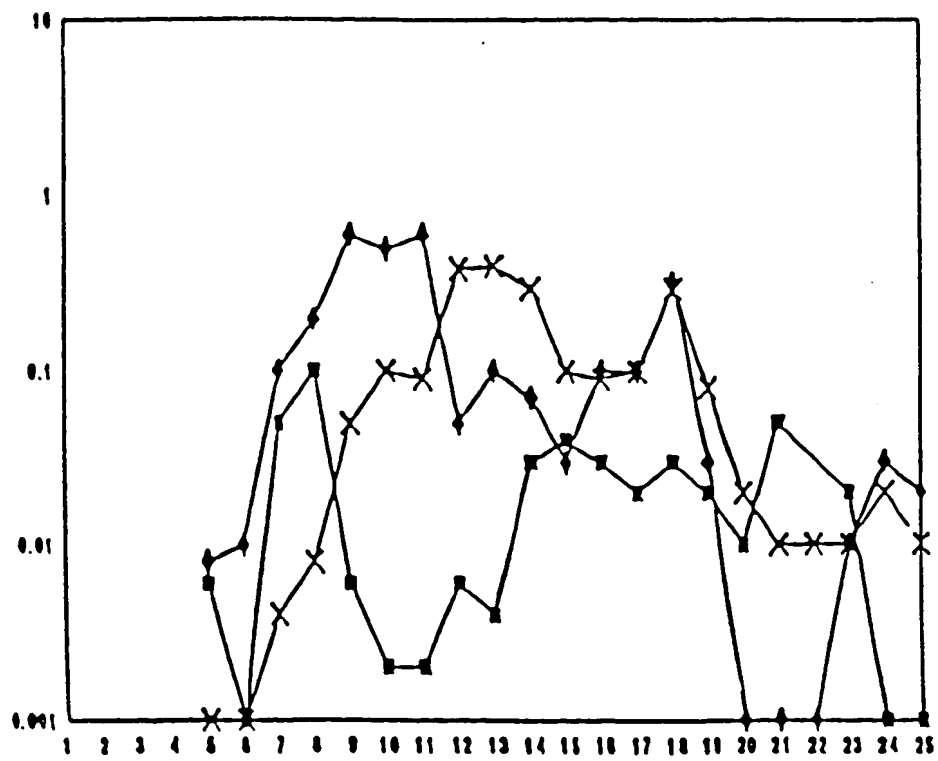


FIGURE 6B

9/11

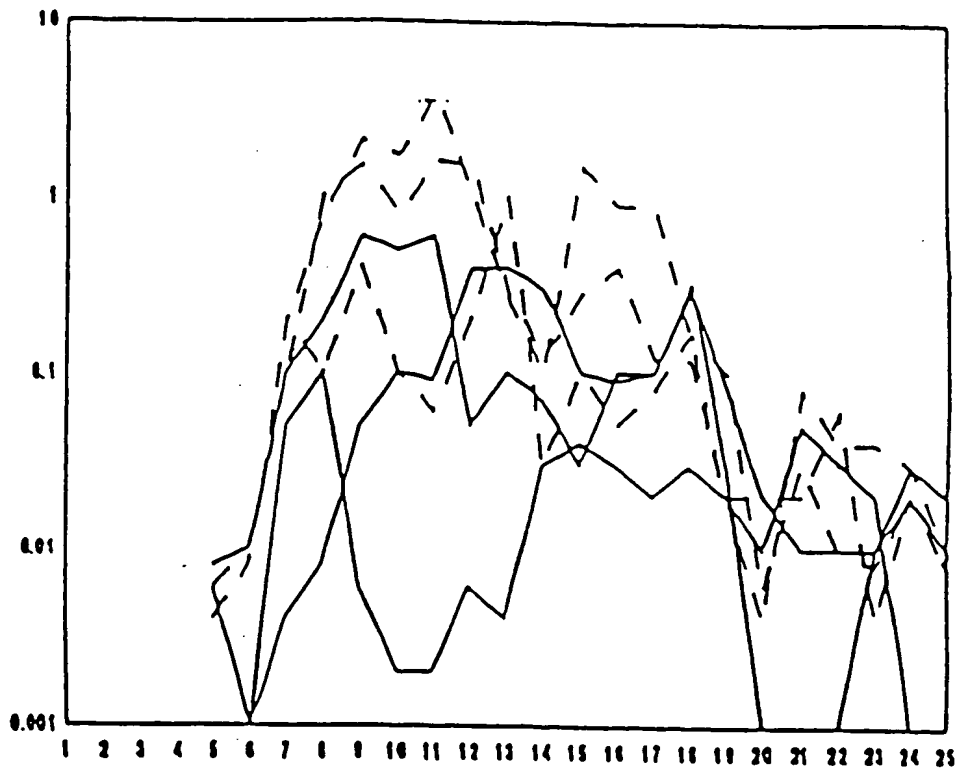


FIGURE 6C

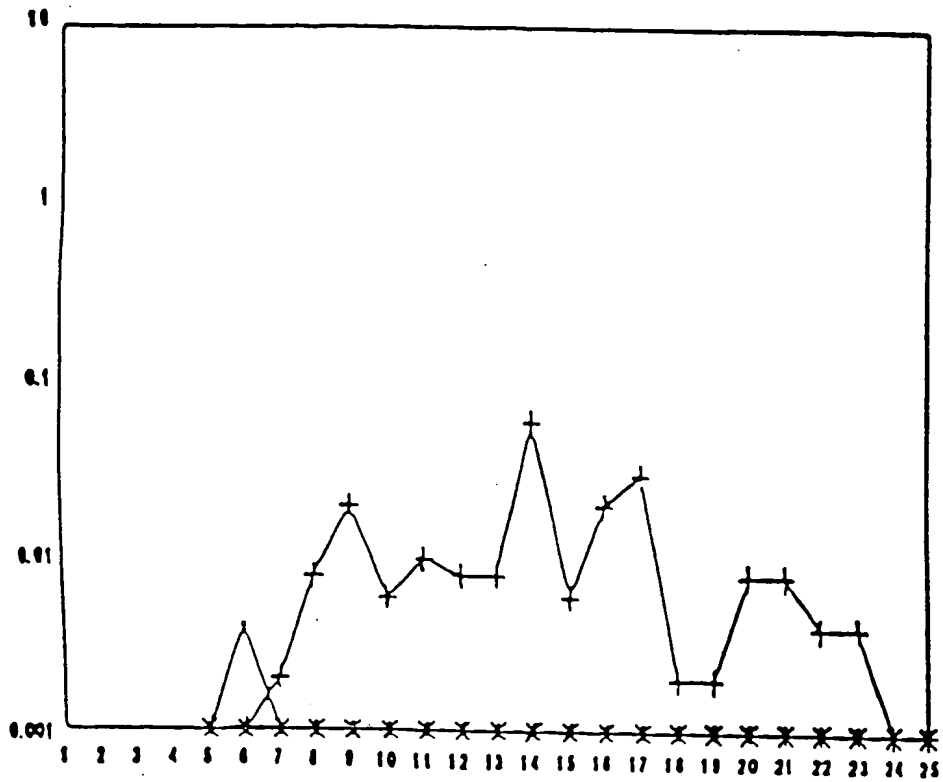


FIGURE 6D

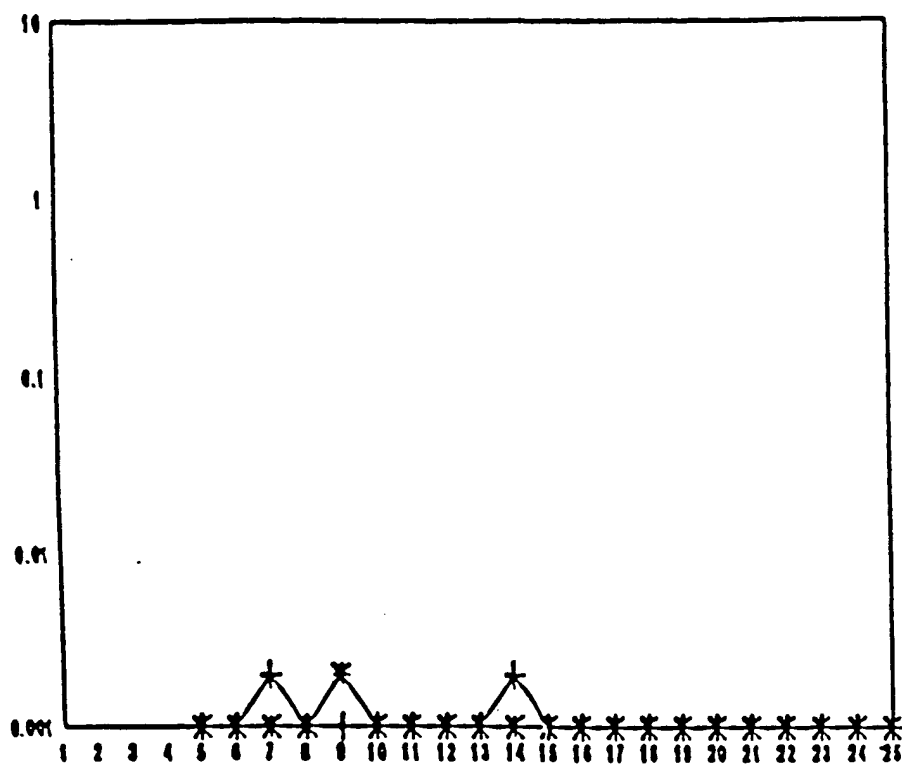


FIGURE 6E

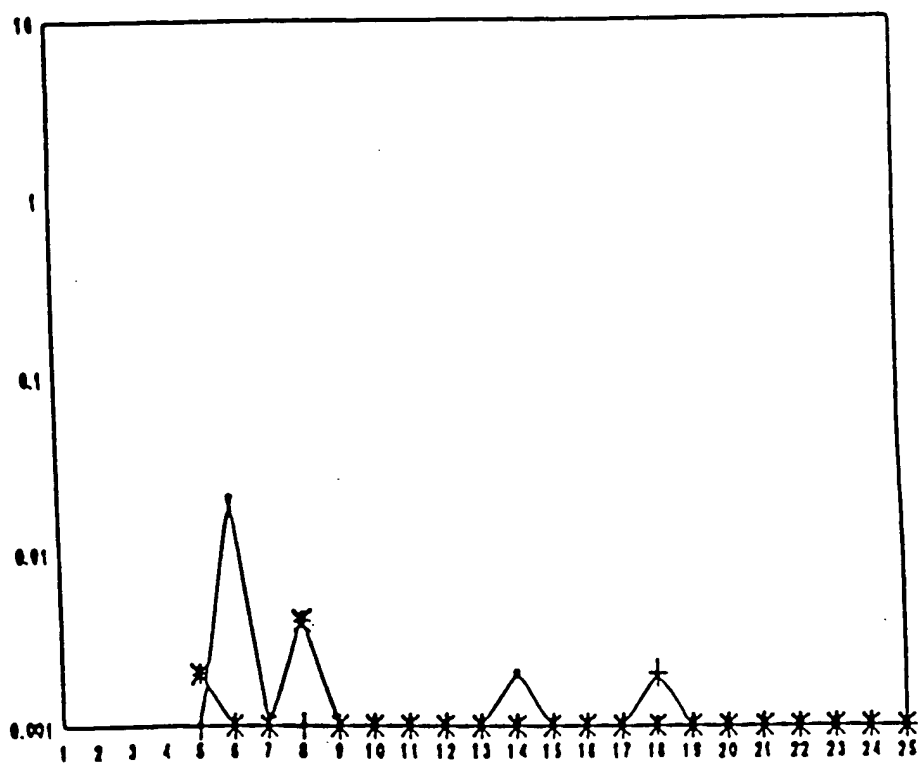


FIGURE 6F

11/11

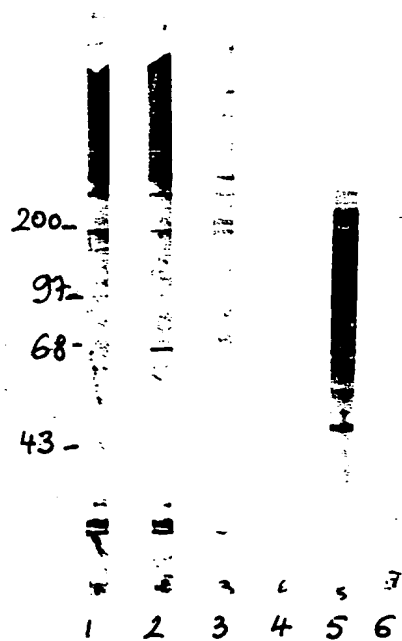


FIGURE 7

This Page Blank (uspto)